



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Deriváty cysteinu – studie prostřednictvím metod
vibrační spektroskopie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Jana Konečná**
Studijní program: N1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Konečná
Název práce	Deriváty cysteinu – studie prostřednictvím metod vibrační spektroskopie
Typ práce	diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Předkládaná práce se zabývá studiem L-cysteinu a jeho derivátů (L-cystin, N-acetyl-L-cystein methylester, N-acetyl-S-phenyl-L-cystein, taurin) prostřednictvím metod infračervené a Ramanovy spektroskopie. Byla provedena interpretace spekter vzorků v pevném skupenství a pomocí různých měřících metod (UV-Vis, DLS, zeta potenciál) byla sledována interakce L-cysteinu a jeho derivátů ve dvou nebo třech finálních koncentracích s rozdílně připravenými koloidními roztoky zlatých a stříbrných nanočástic s cílem zachytit signál povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS).</p>
Klíčová slova	vibrační spektroskopie, infračervená spektroskopie, Ramanova spektroskopie, SERS, aminokyseliny, dynamický rozptyl světla, zeta potenciál, stříbrné nanočástice, zlaté nanočástice
Počet stran	90
Počet příloh	2
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Jana Konečná
Title of thesis	Cysteine derivatives – study via vibrational spectroscopic methods
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	Presented work deals with studies of L-cysteine and its derivatives (L-cystine, N-acetyl-L-cysteine methylester, N-acetyl-S-phenyl-L-cysteine, taurine) via infrared and Raman spectroscopy methods. The spectra of the samples in the solid state were interpreted and the interaction of L-cysteine and its derivatives in two or three final concentrations with differently prepared colloidal gold and silver nanoparticles was monitored by using different measuring methods (UV-Vis, DLS, Zeta potential) in order to capture the surface-enhanced Raman scattering (SERS) signal.
Keywords	vibrational spectroscopy, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, SERS, amino acids, dynamic light scattering, zeta potential, silver nanoparticles, gold nanoparticles
Number of pages	90
Number of appendices	2
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením *doc. RNDr. Karolíny Machalové Šiškové, Ph.D.*, za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Srdečně děkuji *doc. RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, Ph.D.* za její odborné vedení, cenné rady, psychickou podporu, bezmeznou vstřícnost a čas, který mi při řešení práce věnovala. Dále chci poděkovat *RNDr. Josefu Kapitánovi, Ph.D.* za laskavou pomoc při měření na Ramanově spektrometru na Katedře optiky.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Cystein a jeho deriváty	11
2.1.1	L-cystein, cystin	12
2.1.2	Taurin	19
2.1.3	N-acetyl-S-phenyl-L-cystein (NAPCy)	21
2.1.4	N-acetyl-L-cystein methylester (NACyM)	22
2.2	Vibrační spektroskopické metody	23
2.2.1	Infračervená spektroskopie (IČ)	24
2.2.2	Ramanova spektroskopie	29
2.3	Vybrané metody studia koloidních soustav	33
2.3.1	UV-Vis absorpce	33
2.3.2	Měření potenciálu zeta	34
2.3.3	Dynamický rozptyl světla (DLS)	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	Chemikálie	38
3.2	Příprava zásobních roztoků	38
3.3	Stříbrné a zlaté koloidy	39
3.3.1	Příprava stříbrného borohydridového koloidu AgBhIV	40
3.3.2	Příprava zlatého borohydridového koloidu AuBhII	40
3.3.3	Příprava vzorků	40
3.4	Měření infračervené absorpce	41
3.5	Měření absorpce (extinkce) v UV-Vis oblasti	41
3.6	Měření Ramanova rozptylu a SERS	41
3.7	Měření DLS a zeta potenciálu	42
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
4.1	Cystein a jeho deriváty v pevném skupenství měřené prostřednictvím IČ absorpce ...	43
4.2	Cystein a jeho deriváty v pevném skupenství a v roztoku měřené prostřednictvím Ramanova rozptylu při excitaci 785 nm	48
4.3	Interakce studovaných látek s koloidy	53

4.3.1	Interakce L-cysteinu sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu.....	53
4.3.2	Interakce NACyM sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu.....	65
4.3.3	Interakce taurinu sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu.....	69
4.3.4	Interakce NAPCy sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu.....	71
5	ZÁVĚR	83
6	POUŽITÁ LITERATURA	84
7	PŘÍLOHY	89

SEZNAM ZKRATEK

AgBhIV	Stříbrný borohydridový koloid
AgCitr	Stříbrný citrátový koloid
AgHAC	Stříbrný hydroxylaminový koloid
ATR	Technika zeslabeného úplného odrazu
AuBhII	Zlatý borohydridový koloid
AuCitrLM	Zlatý citrátový koloid Lee-Meisel
CBS	Cystathionin β -synthasa
DLS	Dynamický rozptyl světla
ECT	Extracelulární tekutina
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GSH	Glutathion
GSSH	Glutathion disulfid
IČ	Infračervená spektroskopie
LSPR	Lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance
NACyM	N-acetyl-L-cystein methylester
NAPCy	N-acetyl-S-phenyl-L-cystein
Nd-YAG	Yttrium aluminium granát obohacený neodymem
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SERS	Povrchem zesílený Ramanův rozptyl

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Vibrační spektroskopie (Ramanova a infračervená spektroskopie, dále IČ) zahrnuje metody, které detailněji určují strukturu molekul u zkoumaných materiálů. Toho lze využít v analytické a forenzní chemii, biochemii, farmacii, medicíně, astronomii, biofyzice a mnoha dalších odvětvích.

Principem IČ spektroskopie je absorpce infračerveného záření, při níž dochází ke změnám vibračně-rotačních energetických stavů molekul v závislosti na změnách dipólového momentu. Ramanova spektroskopie je spektroskopická technika založena na nepružném rozptylu záření. Nejintenzivnější pásy pocházejí od vibrací, při kterých dochází k největší změně polarizovatelnosti. Metoda je vysoce citlivá a na rozdíl od IČ umožňuje zkoumání vzorku i ve vodném roztoku. Ramanův rozptyl je slabý jev. Při snaze o vznik silnějšího kvantového jevu (např. nastavením laseru na vysoký výkon) může docházet k nežádoucím fluorescencím nebo k degradaci vzorku. Proto bylo ve vědeckém zájmu nalézt způsob, jak Ramanův rozptyl zesílit a vznikla metoda SERS (*Surface-enhanced Raman spectroscopy*), která pro zesílení Ramanova rozptylu využívá nanočástice ušlechtilých kovů.

Nanotechnologie čím dál více ovlivňují všechny oblasti vědy, ale i každodenní lidské životy. S rostoucím využitím nanočástic je lidský organismus stále více vystavován jejich kontaktu. Možným rizikům vlivu nanočástic se věnuje podobor nanotoxikologie. Zvláště velká pozornost je toxicitě věnována při používání nanočástic v medicíně. Nanočástice lze využít například pro cílenou terapii ve formě nanonosičů při řešení problémů neselektivní toxicity cytostatik, působících nejen na nádorovou, ale i na zdravou tkáň.

V této práci byla zkoumána interakce zlatých a stříbrných nanočástic s aminokyselinou L-cysteinem a vybranými deriváty, a to z toho důvodu, že oproti interakcím nanočástic s proteiny není interakcím na úrovni aminokyselin věnována taková pozornost. Cíleno bylo na vibrační spektra vybraných derivátů cysteinu v porovnání s cysteinem samotným.

Vytyčeny byly následující cíle:

- Změřit a interpretovat IČ a Ramanova spektra od příslušných látek v pevném stavu.
- Zkoumat Ramanova spektra roztoků látek v deionizované vodě.
- Provést přípravu stříbrných a zlatých nanočástic redukčním procesem.
- Charakterizovat roztoky systémů různých typů stříbrných a zlatých nanočástic s L-cysteinem a jeho deriváty pomocí vybraných měřících metod a diskutovat rozdíly v interakcích s ohledem na rozdílné chemické složení povrchů nanočástic.
- Změřit SERS spektra za použití Ag a Au nanočástic.
- Zjistit, zda se studované látky vážou na povrch Ag a Au nanočástic, a pokud ano, tak jakým způsobem.
- Interpretovat a porovnat naměřená data s daty dostupnými v literatuře.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cystein a jeho deriváty

Cystein je alifatická sirá aminokyselina. Aminokyseliny lze získat hydrolýzou z peptidů či bílkovin nebo je připravit synteticky. Jedná se o pevné krystalické látky. Vzájemně se od sebe liší charakterem postranního řetězce – radikálu R. Díky přítomnosti funkčních skupin z nich lze odvozovat různé deriváty. Aminoskupina může být acylována či alkylována, karboxyl aminokyselin lze esterifikovat, nebo z něj lze s aminoskupinou jiné aminokyseliny vytvořit substituované amidy za vzniku peptidové vazby apod. Funkční skupiny derivátů udílejí molekulám typické vlastnosti a podmiňují reakce lišící se od mateřských molekul. Molekula derivátu organické sloučeniny jako celku je vždy integrální výslednicí vlivů jak uhlovodíkového zbytku, tak všech funkčních skupin derivátu, přičemž funkční skupiny hrají zpravidla vedoucí roli (Duchoň, 1985; Kodíček et al., 2015)

Kromě aminové a karboxylové skupiny je v molekule cysteinu přítomna thiolová skupina. O tom, která z funkčních skupin bude disociovat jako první, rozhodují hodnoty disociačních konstant (pK). Hodnoty pK_a funkčních skupin volného cysteinu jsou 1.71 (karboxylová skupina), 8.33 (thiolová skupina) 10.78 (aminoskupina), (Kotyk a Slavík, 1989; Kodíček et al., 2015).

Z anorganické chemie je známo, že síra je homologem kyslíku, stejně tak i v organických sloučeninách může síra kyslík zastupovat. Vznikající analogy alkoholů se souhrnně nazývají thioly nebo též hydrosulfidy (Duchoň, 1985). Cystein je spolu s methioninem proteinogenní aminokyselina obsahující síru. Dalšími běžně se vyskytujícími kyselinami obsahujícími síru, jsou např. homocystein a taurin. Přestože se nejedná o aminokyseliny účastnící se proteosyntézy, mají tyto sloučeniny jiné důležité fyziologické funkce. Obecně lze o molekulách odvozených z cysteinu říci, že jejich častou společnou vlastností je antioxidantní charakter, tj. schopnost boje proti oxidačnímu stresu (Brosnan a Brosnan, 2006).

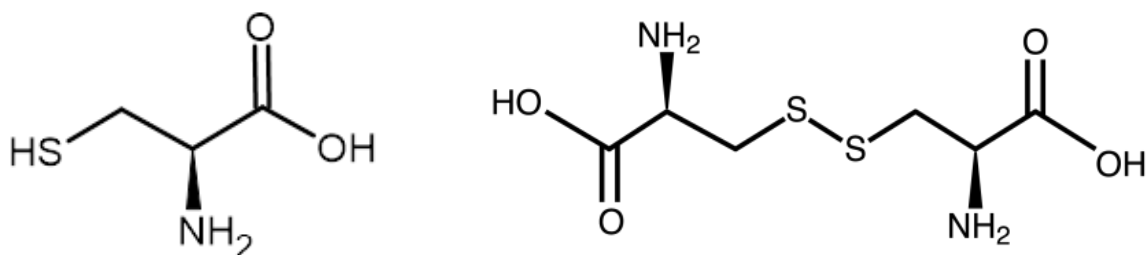
Analog cysteinu, v němž je síra zaměněna za selen, se nazývá selenocystein. Obvykle je označován jako 21. proteinogenní aminokyselina a je obsažen např. v savčí glutathionperoxidase a některých bakteriálních enzymech. Lze ji považovat za derivát cysteinu, avšak přirozeně nevzniká modifikací cysteinu,

ale odvozením od serinu. Ve srovnání s cysteinem má selenocystein vyšší redoxní potenciál (Kvíčala a Lapčík, 2002; Kodíček et al., 2015).

Mezi deriváty L-cysteinu patří také významné bioaktivní látky obsažené v česneku a cibuli. Sloučeniny odpovědné za specifické česnekové aroma jsou obvykle aminokyseliny nebo jejich deriváty obsahující síru. Příkladem těchto látek jsou γ -glutamyl-S-allyl-L-cystein nebo S-allylcystein sulfoxidy (Konvička, 1998; Kvíčala a Lapčík, 2002).

Kromě aminové, karboxylové a thiolové funkční skupiny mateřského cysteinu, bude diskutována také acetylová, fenylová, methylesterová a sulfonová funkční skupina obsažená ve vybraných cysteinových derivátech.

2.1.1 L-cystein, cystin



Obr. 1 Struktura molekuly L-cysteinu a cystinu

Cystein (viz Obr. 1) lze strukturně popsat jako substituční derivát karboxylové kyseliny obsahující aminovou a thiolovou skupinu. Jedná se o chirální, opticky aktivní molekulu, existující ve dvou konfiguracích (L- a D-forma). V proteinech se nachází pouze ve formě konfigurace L. Většina přirozeně se vyskytujících chirálních L-aminokyselin jsou stereoisomery S. L-cystein je výjimkou, protože je stereoisomerem R (Jakubowski, 2019; Kodíček et al., 2015).

Na základě chemické podobnosti hydroxylové a thiolové skupiny lze předpokládat, že thiolová skupina cysteinu se bude chovat obdobně jako hydroxylová skupina strukturně podobného serinu. Navzdory této podobnosti se chování těchto skupin liší. Důležitou odlišností je nízká elektronegativita síry ve srovnání s elektronegativitou kyslíku. Přestože lze cystein považovat za polární aminokyselinu snadno tvořící vodíkové vazby, v proteinech má překvapivě hydrofobní charakter. Z proteomických studií je patrné, že se řetězce cysteinu chovají více jako hydrofobní aminokyseliny methionin, tryptofan nebo tyrosin.

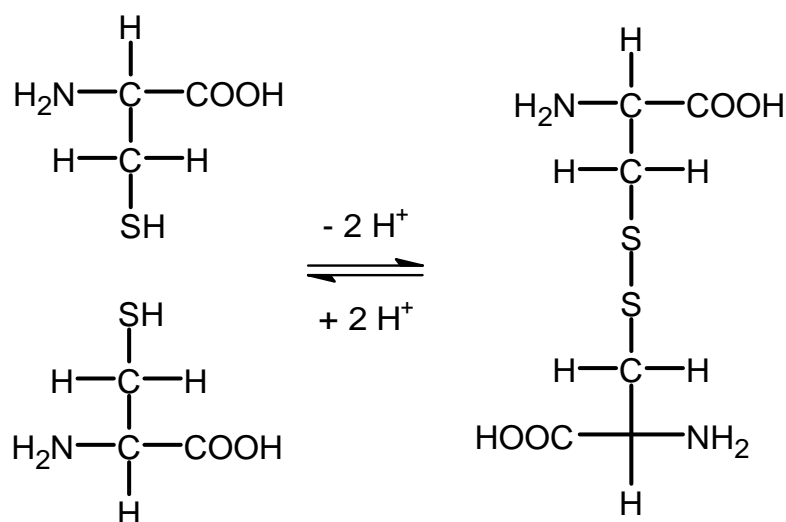
Vysvětlením tohoto neobvyklého hydrofobního chování je neschopnost síry tvořit s vodou vodíkové můstky (Nagano et al., 1999; Brosnan a Brosnan, 2006)

Atom síry je jeden z nejlepších nukleofilů, což dělá thiolovou skupinu vysoce reaktivní. Cystein se účastní řady enzymatických a biochemických reakcí a má mnoho dalších biologických funkcí (Duchoň, 1985). Vyznačuje se také vysokou afinitou k těžkým kovům, čehož se využívá v chelatační terapii při otravách těžkými kovy (Flora a Pachauri, 2010). Chelatační role cysteinu je uplatněna také v případě strukturního motivu, tzv. zinkového prstu, typického pro proteiny interagující s nukleovými kyselinami. Cystein se v této formaci spolu s histidinem účastní koordinační vazby kovového ligandu Zn^{2+} (Kodíček et al., 2015).

Oxidací thiolů vznikají disulfidy. Cystein snadno podléhá dehydrogenaci (oxidaci) za vzniku cystinu (viz Obr. 2). Molekuly cystinu jsou propojeny kovalentní vazbou – disulfidovým můstkem (Kodíček et al., 2015). Tato reakce je vratná, hydrogenací (redukci) mohou opět vznikat původní thioly (Duchoň, 1985). Schopnost tvořit disulfidové vazby, tedy relativní snadnost reverzibilní oxidace a redukce cysteinu, hraje klíčovou roli ve struktuře a skládání bílkovin, je rozhodující pro udržení přiměřeného redoxního potenciálu a zodpovídá za katalytickou funkci a aktivitu některých proteinů. Naopak nekontrolovaná ireverzibilní modifikace (denaturace) může vést k poškození proteinů s potenciálně škodlivými důsledky (Brosnan a Brosnan, 2006; Papet et al., 2018).

Disulfidové můstky mohou stabilizovat prostorovou strukturu jednoho peptidového řetězce, pak se jedná o intramolekulární můstky. Příkladem samostatné peptidové struktury obsahující disulfidovou vazbu jsou molekuly endogenních opioidních peptidů enkefalinů nebo peptidických hormonů oxytocinu a vasopresinu. Intermolekulární disulfidové můstky propojují minimálně dva odlišné řetězce. Takovými vazbami jsou spojeny například dva těžké a dva lehké řetězce imunoglobulinů nebo vlasový α -keratin – nerozpustný protein bohatý na cystein. Redukce disulfidových můstků α -keratinu (např. thioglykátom amonným) umožňuje použití metody trvalé ondulace. Struktura vlasu je rozvolněna a stočena do požadovaného tvaru, po oxidaci thiolových skupin (např. zředěným peroxidem vodíku) dojde k obnovení disulfidových můstků a ke zpevnění vlasu do požadovaného tvaru (Kodíček, 2015)

Ačkoli je cystin symetrická molekula, hodnoty pK_a stejných funkčních skupin se vzájemně výrazně liší. Důvodem je posloupná disociace – druhý náhodně disociovaný proton karboxylové skupiny je odpuzován slaběji než první a analogicky, druhý proton je k aminoskupině vázán silněji, čímž je pK_a druhé aminoskupiny vyšší.



Obr. 2 Schéma redoxní reakce cystein - cystin

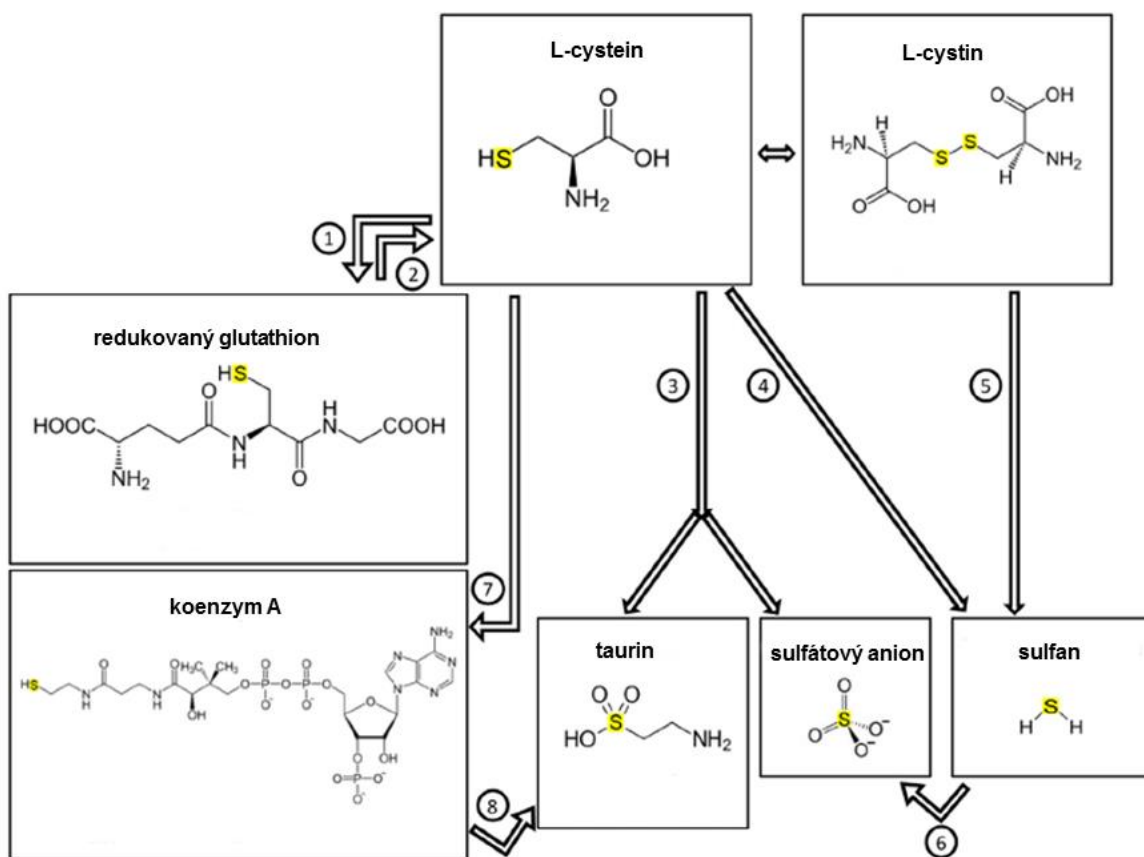
2.1.1.1 Význam cysteinu a cystinu pro organismus

Cystein patří mezi podmíněně esenciální aminokyseliny, tedy mezi aminokyseliny, jejichž biosyntéza je závislá na jiné esenciální aminokyselině. Lidský organismus může získávat cystein prostřednictvím tří zdrojů: vstřebáváním z potravy, rozkladem endogenních proteinů nebo endogenní syntézou z esenciální aminokyseliny methioninu (Yin et al., 2016). Metabolismus sirných aminokyselin je úzce spjat. Přeměna methioninu na cystein je jednosměrná reakce probíhající převážně v játrech. Reakce je uskutečněna ve dvou základních krocích – transmethylace a transsulfurace. Z methioninu vzniká za spotřeby ATP molekula S-adenosylmethionin (SAM), označovaná jako „aktivní methyl“. Molekula SAM je významným dárcem methylové skupiny při biosyntéze různých látek (např. adrenalinu, cholinu, L-karnitinu a kreatinu). Odevzdáním methylové skupiny vzniká S-adenosylhomocystein, který hydrolyzou odštěpuje adenosin a je přeměněn na homocystein – produkt transmethylační reakce. Homocystein může být dle potřeb organismu buď opětovně methylován na methionin nebo je za účasti serinu transsulfurační reakcí transformován v cystathionin, ze kterého enzymatickým štěpením vzniká cystein (Duchoň, 1985; Plaza et al., 2018). Biosyntéza je závislá na dostupnosti enzymů a jejich substrátů. Přeměna homocysteinu na cystathionin je katalyzována enzymem CBS (cystathionin β -synthasa), jehož substrátem je pyridoxin (vit. B6). Rekonverze homocysteinu na methionin se účastní enzym methionin synthasa, který je závislý na kobalaminu (vit. B12) a kyselině listové (vit. B9). Transsulfuračním procesem předává methionin cysteinu pouze atom síry, uhlíková kostra pochází ze serinu (Papet et al., 2018). Nedostatek zmíněných vitamínů skupiny B, ale i jakékoli jiné narušení biosyntetické dráhy, se stává příčinou metabolických poruch. Jedním z takových onemocnění je homocysteinurie, která se vyskytuje ve familiární nebo získané formě. Familiární homocysteinurie je autosomálně recesivní onemocnění, nejčastěji způsobené defektem tvorby některého z enzymů biosyntetické dráhy, což vede k nízkému až žádnému vytváření cysteinu a ke zvýšené produkci homocysteinu. Získaná forma nemoci může být způsobena z již zmíněných nutričních důvodů, tedy zejména z nedostatku vitamínů skupiny B, které jsou substrátem enzymů účastnících se methioninového metabolismu. Homocysteinurie je projev přítomnosti homocysteinu v moči, vysoké hodnoty

homocysteinu jsou při tomto stavu také v krvi (hyperhomocysteinémie). Porucha může způsobovat rozličné patologické situace. V cévách se homocystein zachytává na stěny endotelu a zvyšuje riziko vzniku aterosklerotického plátu, čemuž negativně přispívá i vazba homocysteinu na krevní destičky podporující jejich agregaci a tvorbu sraženin. Navázání homocysteinu na fibrin v kostech způsobuje osteoporózu a při vazbě na svalová vlákna závěsného aparátu čočky vede k onemocnění zvanému *ectopia lentis*. Nedávné výzkumy také prokázaly spojitost s neurodegenerativními onemocněními, cukrovkou a megaloblastickou anémií (Papet et al., 2018). Dle Hasan et al., (2019) existuje také úzká souvislost poruchy odbourávání homocysteinu se vznikem nádorových onemocnění.

V extracelulárním prostoru (ECT) lidského organismu se nachází výlučně L-cystin, protože za normálních ECT podmínek L-cystein na L-cystin velmi rychle oxiduje. Cystin je také nejčastějším patologickým nálezem aminokyseliny v moči. Cystinurie zodpovídá za 1–2 % ledvinových kamenů u dospělých a 6–8 % u dětí. Tento typ močových kamenů vzniká v důsledku mutací způsobujících poruchy cystinové resorpce a renálního transportu. Fyziologicky je ledvinami resorbováno 99 % filtrovaného cystinu. U pacientů s cystinurií, koncentrace cystinu v tubulech překračuje práh rozpustnosti cystinu, což vede k tvorbě cystinových krystalů a kamenů (Duchoň, 1985; Plaza, García-Galbis a Martínez-Espinosa, 2018).

U zdravých jedinců je cystin do intracelulárního prostoru transportován a na cystein redukován dle potřeb buňky. Rovnováha mezi L-cysteinem a L-cystinem hraje v organismu zásadní roli při regulaci redoxního potenciálu a syntéze dalších aktivních sloučenin metabolicky vázaných na cystein. Cystein je prekurzorem glutathionu (GSH) a koenzymu A. Degradací cysteinu vzniká taurin, pyruvát, sulfan a sulfáty. Přehled významných sloučenin metabolicky vázaných na cystein uvádí Obr. 3 (Yin et al., 2016; Papet et al., 2018).



Obr. 3 Sloučeniny metabolicky vázané na cystein: Cystein je stavebním prvkem pro syntézu glutathionu (1). Degradací glutathionu může cystein opět vznikat (2). Oxidační degradační dráhou cysteinu vzniká taurin nebo sulfátový aniont (3). Desulfurační dráhou degradace vzniká sulfan (4), který může vznikat také odsířením cystinu (5) a homocysteinu (není zobrazen). Sulfan je metabolizován na sulfáty (6). Cystein je prekurzorem v syntéze koenzymu A (7). Degradací koenzymu A vzniká taurin (8). Převzato a upraveno z Papet et al., (2018)

Většina těchto metabolických sloučenin má svoji aktivní fyziologickou funkci:

Koenzym A je makroergní sloučenina účinkující v celé škále metabolických reakcí. Účastní se zejména β -oxidace mastných kyselin a biosyntézy lipidů. Endogenní sulfan je protizánětlivé, antioxidační a neuroprotektivní činidlo, působící také jako vasorelaxační faktor, tedy jako prostředek snižující krevní tlak (Yin et al., 2016; Papet et al., 2018).

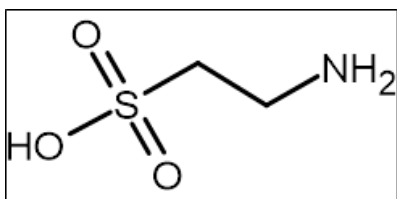
Glutathion (GSH) je neobvyklý tripeptid tvořený cysteinem, glutaminem a glycinem. Jedná se o nejhojnější thiolovou sloučeninu intracelulárního prostoru, kde se z více než 99 % vyskytuje v redukované GSH formě. Jeho stabilita a nízký redoxní potenciál jsou zajištěny neobvyklou gama vazbou mezi glutamátem a cysteinem, díky které může v buňce existovat v relativně vysokých koncentracích (γ -glutamyllová vazba činí GSH rezistentní na peptidasy). Glutathion

chrání buňky před toxickým množstvím endogenních a exogenních elektrofilů, redukuje nebezpečné oxidanty (ROS, RNS), čímž se sám oxiduje za vzniku glutathion disulfidu (GSSG). Kromě antioxidačních účinků dále ovlivňuje aktivitu a stabilitu některých proteinů prostřednictvím posttranslační modifikace – glutathionylace, která chrání proteiny před nevratnou oxidací thiolové skupiny (Klomsiri et al., 2011; Papet et al., 2018). Dále se glutathion také účastní konjugační fáze biotransformace xenobiotik, při které mohou vznikat merkapturové kyseliny, včetně N-acetyl-S-phenyl-L-cysteinu diskutovaného v kap. 2.1.3. Taurin bude diskutován v kap. 2.1.2.

2.1.1.2 Cystein v průmyslu

Zájem o průmyslovou výrobu této aminokyseliny je velký. L-cystein se stal žádanou sloučeninou zvláště ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu cysteinových doplňků stravy. Počet klinických studií testujících jejich efekt je poměrně nízký, a proto přináší L-cystein ve formě doplňků stravy značnou kontroverzi (Plaza et al., 2018). U metabolicky zdravých jedinců je obsah methioninu i cysteinu z proteinů běžné stravy obvykle dostačující a suplementace těchto aminokyselin není nutná. Nejvíce sirných aminokyselin obsahují obiloviny a maso. Nutriční deficit tak může teoreticky nastat u jedinců dodržujících extrémní rostlinnou dietu, založenou na špatně stravitelných proteinech nebo na rostlinných proteinech s velmi nízkým obsahem sirných aminokyselin (např. luštěniny). Při patologických stavech, kdy jsou požadavky na cystein prokazatelně vyšší než endogenní syntéza, je suplementace cysteinem poměrně běžná. Tato terapie je aplikována například při dědičných metabolických poruchách nebo u předčasně narozených dětí, které mají přirozený nedostatek enzymu CBS účastnícího se syntézy cysteinu. Cystein se používá také k výrobě dochucovadel, chelatačních činidel nebo pleťové a vlasové kosmetiky (Papet et al., 2018; Plaza et al., 2018).

2.1.2 Taurin



Obr. 4 Struktura taurinu

Taurin (2-aminoethansulfonová kyselina, viz Obr. 4) je alifatická sulfonová kyselina. V odborné literatuře bývá často nazývána aminokyselinou, ve skutečnosti se však jedná pouze o derivát aminokyseliny, neboť postrádá karboxylovou skupinu. Taurin je bílou, krystalickou, ve vodě dobře rozpustnou látkou (Duchoň, 1985). Ve vodném roztoku má charakter zwitterionu, v pevném krystalickém stavu jsou molekuly drženy trojrozměrnou sítí vodíkových vazeb (N-H ··· O), (Lima et al., 2002; Souza et al., 2005). Taurin je považován za bezpečnou látku s velmi nízkou toxicitou. Molekula je součástí žlučových kyselin a poprvé byla izolována německými vědci v roce 1827 ze žluče býka domácího (lat. *Bos taurus*), odsud pochází jeho název (Abebe a Mozaffari, 2011). Vysoká koncentrace taurinu je pozoruhodná i v dalších tělních tekutinách a tkáních. Jedná se o nejhojnější volnou „aminokyselinu“ živočišných tkání (Lima et al., 2002; Brosnan a Brosnan, 2006). V rostlinách, až na výjimky (např. řasy) zcela chybí (Ceccotti et al., 2019).

2.1.2.1 Význam taurinu pro organismus

Taurin je sloučenina metabolicky vázaná na cystein (viz Obr. 3, kap. 2.1.1.1). Zdrojem taurinu může být potrava nebo endogenní biosyntéza v játrech, při které vzniká jako oxidační a dekarboxylační produkt cysteinu. Cystein je oxidační degradační dráhou nejprve enzymaticky katalyzován na cystein sulfinát, ten podléhá dekarboxylaci za vzniku hypotaurinu, který oxiduje na taurin (Bin et al., 2017; Papet et al., 2018). Biosyntetická kapacita taurinu se u různých živočišných druhů výrazně liší. Například kočky postrádají endogenní biosyntézu taurinu úplně. Výrazně se liší také distribuce taurinu v rámci daného organismu. V lidském organismu jsou nejvyšší hladiny ve žluči, střevě, srdci, kosterním svalstvu, mozku, nervech, játrech, ledvinách, sítnici a leukocytech (Abebe a Mozaffari, 2011). Taurin se nachází také v mateřském mléce. V tkáních plodu i novorozence je obsah taurinu velmi vysoký a s věkem rychle klesá (Freire et al., 1996; Hardy a Norwood, 1998).

Nejvíce taurinu je obsaženo v potravinách živočišného původu, zejména ve vejcích, mase a mořských plodech (Papet et al., 2018). Významně nižší koncentrace taurinu byly zjištěny v krvi a moči veganů (Laidlaw et al., 1987). Přijatý i endogenní taurin je do intracelulárního prostředí transportován buď stereospecifickými aktivními transportéry nebo při vysokých koncentracích pasivně difúzí (Abebe a Mozaffari, 2011).

Taurin má v organismu řadu fyziologických funkcí. Účastní se osmoregulace, vývoje plodu a konjugace žlučových kyselin. Zásahuje do činnosti neurotransmiterů, ovlivňuje homeostázu vápníku a je nezbytný pro tvorbu fotoreceptorů (Brosnan a Brosnan, 2006; Abebe a Mozaffari, 2011). Podílí se na snižování krevního tlaku, stimulaci glykolýzy a glykogeneze nebo na odstraňování toxinů díky svým antioxidačním vlastnostem (Moreira et al., 2018). Dále optimalizuje nervový přenos a pomáhá překonávat pocit fyzického a psychického vyčerpání (Bromová et al., 2010).

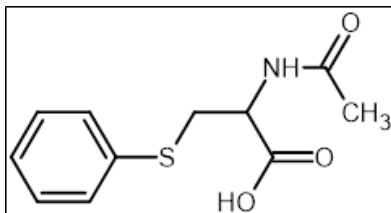
2.1.2.2 Taurin v průmyslu

V důsledku zmiňovaného množství příznivých vlivů na organismus je taurin stálým předmětem vědeckých výzkumů a jeho průmyslové využití je široké. Taurinem jsou běžně obohacovány kojenecké výživy nebo krmiva koček a ryb (Brosnan a Brosnan, 2006; Ceccotti et al., 2019). Poměrně velké množství taurinu se přidává ve směsi s jinými doplňky (např. s kofeinem, guaranou, kreatinem) do energetických nápojů. Samotný taurin je bezpečná složka energetického nápoje, účinky kofeinu však mnohonásobně zesiluje, a tak zvláště v této kombinaci může tělu ublížit (Bromová et al., 2010). Další využití taurinu je při výrobě vlasové kosmetiky (Collin et al., 2006) nebo prostředků upravujících vodu v bazénech (Papet et al., 2018).

Taurin je studován i pro další biologické i nebiologické aplikace, mezi něž patří například elektropolymerizace tenkých vrstev taurinu pro výrobu chemických senzorů a biosenzorů, inkorporace taurinu do membrán a filmů pro nanofiltraci nebo získávání zlata z vody pomocí taurinem modifikované celulózy. Většina těchto aplikací je založena na modifikaci taurinu a jeho interakcí s nanočásticemi (Moreira et al., 2018). Kumar et al., (2020) dále použili taurin jakožto stabilizační

obálku zlatých nanočástic s cílem snížit toxicitu kovových nanočástic používaných v nanomedicíně.

2.1.3 N-acetyl-S-phenyl-L-cystein (NAPCy)

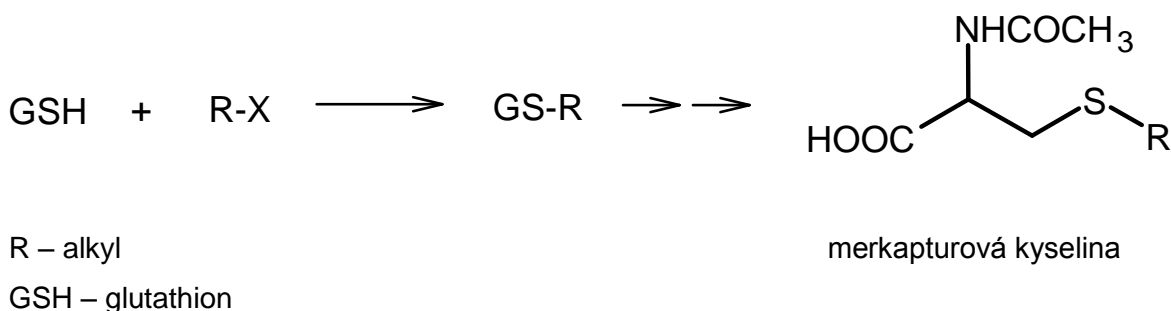


Obr. 5 Struktura NAPCy

N-acetyl-S-phenyl-L-cystein (dále NAPCy) neboli kyselina S-fenylmerkapturová, Obr. 5, patří mezi N-acetyl-S-substituované cysteiny, tj. merkapturáty. Ve srovnání s cysteinem tento derivát nese na svém terminálním atomu dusíku acetylovou skupinu a thiolová skupina je „kryta“ fenylovou funkční skupinou.

2.1.3.1 Význam NAPCy pro organismus

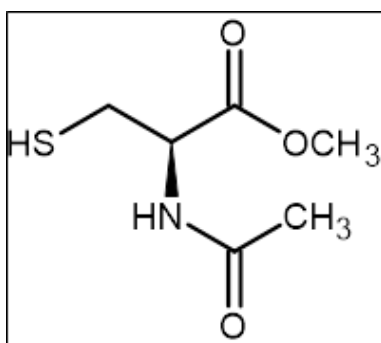
Merkapturové kyseliny, deriváty N-acetylcysteinu, jsou produktem kondenzace cysteinu a aromatických sloučenin. Biologicky se tvoří při biotransformaci xenobiotik, nejčastěji benzenu. V konjugační fázi biotransformace se elektrofilní látky vážou na nukleofilní skupinu SH glutathionu. Tvorba glutathionových konjugátů je katalyzovaná enzymy glutathion-S-transferázami a je mírou schopnosti odbourávat fyziologické biomolekuly a nepřímo také mírou rizika poškození zdraví při přítomnosti některých příslušných látek (např. benzenu) v organismu. Glutathionové konjugáty jsou následně metabolizovány na merkapturové kyseliny, které jsou vyloučeny močí. Při přeměně glutathionových konjugátů na merkapturové kyseliny dochází po dvou hydrolytických krocích nakonec k acylaci aminoskupiny v cysteinu (Horák et al., 2004). Schéma přeměny glutathionových konjugátu zobrazuje Obr. 6.



Obr. 6 Schéma přeměny glutathionových konjugátů na merkapturové kyseliny. Převzato a upraveno z Horák et al., 2004

NAPCy je minoritní metabolit benzenu vylučovaný močí (Haufröid a Lison, 2005). Benzen je nejjednodušší aromatický uhloводík, průmyslově využívané organické rozpouštědlo. Vzhledem k toxicitě je jeho využívání regulováno. Jedná se o látku znečišťující životní prostředí s prokazatelnými karcinogenními účinky. Běžně se vyskytuje při spalování dřeva a uhlí, v emisích motorových vozidel, ve výparech benzínu nebo v cigaretovém kouři (Wulandari et al., 2018). Chronická expozice benzenu může vést k akutní myeloidní leukémii, rakovině plic nebo mnohočetnému myelomu (Wang et al., 2013). Benzen oxiduje na nestabilní epoxid, který je dále přeměňován na fenol a další metabolity (NAPCy, katechol, hydrochinon a trans-mukonovou kyselinu), (Horák, Linhart a Klusoň, 2004; Wulandari et al., 2018). Stanovení NAPCy v moči je používáno jako vysoce specifický a citlivý biomarker pro monitorování expozice benzenu a toluenu (Mathias a Hymer, 2017).

2.1.4 N-acetyl-L-cystein methylester (NACyM)



Obr. 7 Struktura NACyM

mateřská kyselina (Duchoň, 1985).

NACyM je předmětem některých vědeckých záměrů. Vyskytuje se jako součást molekuly preklinicky studovaného proléčiva GPA512 s potenciálem pro léčbu rakoviny (Escobar et al., 2016). Poopari et al., 2015 studovali chiralitu a další optické vlastnosti NACyM a N-acetyl-L-cysteinu prostřednictvím infračervené spektroskopie a vibračního cirkulárního dichroismu. Delgado-Pérez et al., 2013 používali kvantové tečky z CdSe/ZnS pro rozlišení chiralit vybraných léčiv, přičemž byl povrch teček modifikován molekulami NACyM.

2.2 Vibrační spektroskopické metody

Zjištění konstituce sloučeniny je v mnoha případech pracné a obtížné. U synteticky připravených sloučenin vyplývá konstituce ze sledu reakcí a její ověření nebývá složité. Náročnějším úkolem je objasnění konstitucí složitějších látek izolovaných z přirozeného materiálu nebo objasnění a pochopení molekulových interakcí, které není možné jednoduše předpovědět. Kombinací rozmanitých chemických a fyzikálních metod lze složité konstituce a interakce zcela objasnit nebo je alespoň přiblížit (Duchoň, 1985; Milata et al., 2008).

Z fyzikálních metod nacházejí největší uplatnění metody spektroskopické, při nichž pozorujeme interakci elektromagnetického záření s molekulami vzorku (s výjimkou hmotnostní spektrometrie). V zásadě mohou nastat tři možné děje – reflexe, rozptyl nebo absorpce paprsku.

Klíčový význam pro studium struktury má absorpce. Energie absorbovaného záření se může spotřebovat na přechody elektronů tvořících chemické vazby, dále na zvýšení vibrační energie chemických vazeb nebo na zvýšení rotační energie molekul (Kováč a Leško, 1980).

Nemalý význam má také studium rozptylu. Vibrace molekul lze určit prostřednictvím přechodů mezi vibračními energetickými hladinami. K přechodu do vybuzeného stavu je potřeba energie, která rozdíl obou stavů odpovídá. Kvanta IČ záření vybudí molekulu ze základní vibrační hladiny do vyššího vibračního stavu a měřením absorbovaného záření vzniká IČ spektrum. Stejný typ informace o vibračních hladinách mohou poskytovat kvanta UV, Vis a IČ záření prostřednictvím neelastického Ramanova rozptylu. Vibrační frekvence molekul jsou tak nezávislé na tom, zda je studujeme IČ nebo Ramanovou spektroskopií, vzájemně se doplňují, avšak intenzity pásů jsou zcela odlišné (Prosser et al., 1989; Milata et al., 2008). Následující podkapitoly jsou zaměřeny na infračervenou a Ramanovu spektroskopii.

2.2.1 Infračervená spektroskopie (IČ)

Principem IČ spektroskopie je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám vibračně-rotačních energetických stavů v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly (při normální vibraci musí představovat oscilující dipól). Získané hodnoty vibračních energií jsou závislé na pevnosti vazeb, molekulové symetrii a hmotnosti jader. Metoda poskytuje informace o přítomnosti a charakteru funkčních skupin, ale též o přítomnosti aromatických jader, dvojných vazeb apod. (Duchoň, 1985; Milata et al., 2008).

IČ pokrývá oblast elektromagnetického spektra v rozsahu délek 800 nm až 1000 μm , běžněji se namísto vlnové délky používá vlnocet, tj. rozsah 12500–10 cm^{-1} . Oblast IČ lze rozdělit na blízkou (NIR, 12500–4000 cm^{-1}), střední (MIR, 4000–400 cm^{-1}) a vzdálenou (FIR, 400–10 cm^{-1}). Uvedená rozmezí jsou spíše konvenční a v literatuře se mohou mírně lišit (Milata et al., 2008). Každá molekula má určitý vibrační stav, který lze absorpcí vhodného záření změnit. Energie záření v této oblasti není dostačující pro excitaci elektronů, způsobuje pouze vibrační a /nebo rotační změny (zvýšení vibrační a /nebo rotační energie). Záření pocházející z FIR oblasti vyvolává změnu rotačních stavů, z MIR a NIR oblasti vyvolává vibračně-rotační přechody. U pevných látek a u roztoků existují dostatečně pevné vazby a rotační pohyb je „zmrazen“, tzn. lze pozorovat pouze vibrace, zatímco u plynných látek je možno pozorovat spektra rotační a rotačně-vibrační. Čistě vibrační spektra se prakticky nepozorují, neboť nastávají-li změny vibračních stavů, jsou doprovázeny současně i změnami rotačními (Milata et al., 2008; Klouda, 2016). Pro identifikaci a určování chemické struktury se nejčastěji používá záření z oblasti MIR (Kania, 2007).

Vibrační pohyb si lze představit jako periodickou změnu mezijaderné vzdálenosti atomů. Vibrace, při kterých se mění délka vazby, se nazývají valenční vibrace a jsou dále klasifikovány jako symetrické a antisymetrické. Vibrace, při kterých se mění vazebný úhel, se nazývají deformační vibrace a lze je dále členit na rovinné a mimorovinné. Při srovnání polohy valenčních a deformačních vibrací téže skupiny atomů jsou frekvence valenčních vibrací vždy vyšší než frekvence vibrací deformačních (Kováč a Leško, 1980; Kania, 2007).

Počet vibrací vazeb závisí na počtu atomů v molekulách. Atomová jádra konají translační, rotační a vibrační pohyby, přičemž každý druh pohybu má určitý

počet stupňů volnosti. Molekula o N atomech má $3N$ stupňů volnosti, z toho 3 stupně translační, další 3 stupně rotační (v případě nelineární molekuly) a zbytek $3N - 6$ stupňů vibračních ($3N - 5$ v případě lineární molekuly – rotační stupně jsou pouze dva). Každý vibrační mód má vlastní systém stacionárních stavů a celkový vibrační stav molekuly je pak jejich souhrnem. Možných vibračních stavů má tak víceatomová molekula obrovské množství (Prosser et al., 1989; Kania, 2007). Dvouatomová molekula má jediný vibrační stupeň volnosti připadající na natahování vazby mezi oběma atomy. Vibrace dvouatomových molekul lze přiblížit modelem harmonického oscilátoru, ve kterém jsou dva hmotné body spojené pružinou. Síla F , která se snaží vrátit hmotné body do jejich rovnovážné polohy je úměrná odchylce délky vazby Δr . Konstanta této úměrnosti k , se nazývá silová konstanta:

$$F = k \Delta r$$

Pro frekvenci vibrace harmonického oscilátoru pak platí rovnice odvozená z Hookova zákona:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

kde ν je frekvence a μ je redukovaná hmotnost, která je zavedena pro dvouatomovou molekulu o hmotnostech m_1 a m_2 a je definovaná vztahem:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Z výše uvedených vztahů plyne, že v případě rostoucí hmotnosti atomů se frekvence (energie) vibrujícího systému snižuje a se zvyšující silovou konstantou (pevností vazby) se frekvence (energie) vibrace zvyšuje (Milata et al., 2008).

Smyslem měření studovaných látek prostřednictvím IČ je určení frekvencí (vlnočtů) při kterých dochází k absorpci, tedy ke změnám vibračních stavů v rámci téhož elektronového stavu. Pro přechody mezi vibračními stavy platí výběrová pravidla. V případě lineárního harmonického oscilátoru jsou jednotlivé stavy

charakterizovány jediným vibračním kvantovým číslem. Dovolenými přechody jsou fundamentální přechody ($1 \leftarrow 0$) a tzv. horké přechody vycházející z tepelně excitovaných hladin ($2 \leftarrow 1$). Frekvence absorbovaného záření je při zmíněných přechodech přímo rovna frekvenci příslušného vibračního módu (Prosser et al., 1989; Milata et al., 2008). Jelikož je většina molekul v základním vibračním stavu, nejsilnějšími realizovanými přechody jsou fundamentální pásy. Výskyt jiných než fundamentálních přechodů je způsoben odchylkami od harmonické aproximace. Model harmonického oscilátoru nerespektuje silnou repulzi mezi nabitými částicemi při malých mezijaderných vzdálenostech ani možnost disociace vazby (Prosser et al., 1989; Kania, 2007). V důsledku anharmonicity se vibrace vzájemně ovlivňují, což má za následek výskyt kombinačních přechodů, které vznikají současnou změnou vibračního kvantového čísla několika vibračních módů. Harmonickému oscilátoru rovněž neodpovídá závislost potenciální energie na velikosti vibrační souřadnice. Energetické hladiny nezachovávají konstantní vzdálenost, rozdíly mezi nimi se pro vyšší kvantová čísla zmenšují. Z tohoto důvodu jsou ve spektru také tzv. svrchní tóny (vyšší harmonické přechody, overtony), tedy přechody se změnou vibračního kvantového čísla Δv o více než 1 (Prosser et al., 1989; Milata et al., 2008). Reálný vlnčet absorpčního pásu je pak ve srovnání s harmonickým oscilátorem nižší (Kováč a Leško, 1980).

Pravděpodobnost uskutečnění přechodu závisí na maticovém elementu tranzitního momentu přechodu, který lze obvykle s vysokou přesností aproximovat elektrickým dipólem molekuly (Kania, 2007). Změna dipólového momentu je základním výběrovým pravidlem a podmínkou pro to, aby byla jakákoliv vibrace v infračerveném spektru aktivní. Čím větší je tato změna, tím je absorpční pás ve spektru intenzivnější. Pokud vibrující molekula nevykazuje změnu dipólového momentu, nedochází k absorpci fotonu infračerveného záření a vibrace je v IČ spektru neaktivní. Všeobecně lze říci, že IČ poskytuje především informace o polárních vazbách v molekule, tedy o funkčních skupinách s heteroatomy. Nepochárné nebo málo polární vazby neposkytují žádné nebo slabé pásy (Milata et al., 2008).

Změny celkového dipólového momentu při vibraci souvisí se symetrií molekuly. Symetrická vibrace nevede ke změnám dipólového momentu. Pokud má

molekula střed symetrie, zůstává při středově symetrických vibracích hodnota dipólového momentu molekuly konstantní, protože pohyb jádra je kompenzován opačným pohybem symetricky položeného jádra (Prosser et al., 1989). Pásky přiřazené těmto vibracím buď nepozorujeme, nebo jsou ve srovnání s antisymetrickými vibracemi mnohem méně intenzivní. Vzhledem k existenci zakázaných pásek je pak reálně pozorovaný počet vibrací nižší než $3N - 6$ (příp. $3N - 5$).

Dalším faktorem, snižujícím počet pásek jsou degenerované vibrace, které se v důsledku shodných frekvencí projevují společným absorpčním pásem. Ke zvýšení počtu pásek ve spektru naopak přispívají slabší pásky svrchních tónů (Milata et al., 2008). Ve spektru víceatomových molekul se mohou objevovat také kombinační vibrace, které vznikají současnou změnou vibračního kvantového čísla několika vibračních módů (Prosser et al., 1989). Interpretaci spekter může dále komplikovat Fermiho resonance, k níž dochází, shoduje-li se frekvence fundamentálního přechodu s některou (původně málo intenzivní) vyšší harmonickou nebo kombinační frekvencí. Namísto dvou překrývajících se pásek dochází v důsledku kvantově mechanické interakce k malým posunům a k vyrovnání intenzit obou pásek za vzniku tzv. Fermiho dubletu (Milata et al., 2008).

Analytickým výstupem metody IČ je pásové spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie (obvykle vyjádřené jako transmitance nebo absorbance) na vlnové délce dopadajícího záření. Pásky odpovídají různým typům vibračních přechodů molekul vzorku (Klouda, 2016). Ve spektrech převažují vibrační přechody. Rotační přechody v kapalinách a tuhých látkách v důsledku interakcí molekul splývají v kontinuum (Milata et al., 2008).

Spektrum se obvykle rozděluje na oblast charakteristických (skupinových) vibrací ($4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) a na oblast otisků prstů ($1500\text{--}670\text{ cm}^{-1}$). V oblasti charakteristických vibrací se nachází pásky vibrací funkčních skupin (Klouda, 2016). Charakteristické vibrace vibrují poměrně nezávisle na zbytku molekuly. Relativně konstantní vlnočety valenční vibrace v různých skupinách vyplývá z konstantní hodnoty silové konstanty vazby v molekulách. Změny seskupení molekul však v charakteristických vlnočtech funkčních skupin způsobují odchylky. Příkladem mohou být CH valenční vibrace methanu (2900 cm^{-1}), ethanu

(3100 cm^{-1}) a acetylenu (3300 cm^{-1}), (Kováč a Leško, 1980). V oblasti otisků prstů se nachází pásy deformačních vibrací. Oblast je velmi silně ovlivněna okolními vazbami i celkovou strukturou molekuly. Takové vibrační chování celého skeletu molekuly je pro každou molekulu unikátní, čehož se využívá pro identifikaci organických látek (Klouda, 2016).

S rozvojem výpočetní techniky došlo k praktickému rozšíření infračervených spektrometrů s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry). U těchto konstrukcí se namísto monochromátoru používá interferometr (k zesílení/zeslabení zdroje) a pro získání klasického spektrálního záznamu vyžadují matematickou metodu Fourierovy transformace. Většina přístrojů je vyrobena pro záznam měření v rozsahu vlnových délek z MIR oblasti. Uspořádání FTIR spektrometrů umožňuje rychlé změření spektra a analýzu vzorků, u nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, tj. měření silně absorbujících vzorků (Stuart, 2013; Klouda, 2016).

Účinnou a rychlou technikou měření IČ spekter je použití FTIR spektrometru s použitím metody zeslabené totální reflexe – ATR (*Attenuated Total Reflection*). Měřený vzorek je v dokonalém kontaktu s krystalem ATR. Je nutné, aby mezery mezi vzorkem a stěnou odrazného hranolu byly podstatně menší než vlnová délka záření. Sériemi tzv. evanescentních vln záření částečně proniká do analyzovaného materiálu. Absorbance vzorku se projeví snížením intenzity odraženého záření (Prosser et al., 1989; Kania, 2007).

IČ absorpční spektroskopie je nedestruktivní, rychlá a relativně levná metoda kvalitativní analýzy organických i anorganických látek ve všech skupenstvích. Vzorkem mohou být např. organické sloučeniny, anorganické a biologické vzorky, oleje, polymery, minerály apod. (Milata et al., 2008; Klouda, 2016). Metoda se používá nejčastěji k identifikaci funkčních skupin bez ohledu na zbytek molekuly nebo k identifikaci konkrétní látky srovnáním s knihovnou spekter. Může být využita i k důkazu nových sloučenin nebo pro výzkum kinetiky chemické reakce (Milata et al., 2008).

2.2.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní analytická metoda založená na nepružném tzv. Ramanovu rozptylu fotonů monochromatického záření zejména z blízké UV oblasti, Vis nebo NIR oblasti (Milata et al., 2008).

Ramanův rozptyl je obvykle buzen zářením, které vzorek neabsorbuje, tedy není schopno excitovat elektron. Zdroj záření musí být velmi intenzivní, neboť Ramanův rozptyl je velmi slabý. Zcela zásadní byl pro tuto techniku vývoj laserů, který se s dostatečným výkonem a dostupností velké škály excitačních vlnových délek, stal ideálním zdrojem záření pro Ramanovu spektroskopii (Strauch, 1994). Využívají se např. lasery Nd-YAG (532 nm), Ar lasery (514 nm) a He-Ne lasery (632 nm), (Stuart, 2013). Při ozařování vzorku laserovým paprskem a v případě, že nedochází k jeho absorpci s elektronovými přechody, je většina procházejících fotonů vzorkem transmitována (plynné a kapalné vzorky) nebo reflektována (tuhé, neprůhledné vzorky). Nestačí-li energie záření na elektronový přechod a je-li vyšší nežli energie vibračních přechodů, tak při anihilaci dopadajícího fotonu tato interakce převede molekulu do velmi nestabilního krátkodobého virtuálního stavu ($< 10^{-14}$ s) a energie dopadajícího fotonu se následně velmi rychle vyzáří do okolí (Milata et al., 2008).

Analýza rozptýleného záření vzorku monochromatickým zářením zahrnuje dvojí typ linií, jednak linie se shodnou frekvencí excitační vlnové délky, pak se jedná o elastický Rayleighův rozptyl (10^{-3} fotonů z původně dopadajícího záření), jednak s frekvencí mírně vyšší nebo mírně nižší, pak se jedná o neelastický Ramanův rozptyl ($\leq 10^{-8}$ fotonů z původně dopadajícího záření), (Strauch, 1994).

Rayleighův rozptyl je znám od roku 1871. Při tomto rozptylu nenastává změna polohy jader molekuly. Počáteční a konečný stav molekuly je shodný, molekula se vrátí z virtuálního stavu do počátečního a energie i frekvence jsou si rovné. Rozptýlené záření o rozdílné frekvenci se nazývá Ramanův rozptyl (Milata et al., 2008).

Ozářením vzorku intenzivním monochromatickým světlem lze ve spektru rozptýleného záření pozorovat kromě budící čáry (elastického Rayleighova rozptylu) i symetricky rozložené slabší linie (způsobeny neelastickou srážkou fotonů s molekulou), přičemž vzdálenost těchto linií je pro rozptylující molekulu

charakteristická a nezávislá na vlnové délce budícího záření (Prosser et al., 1989; Milata et al., 2008). Symetricky rozložené linie po stranách budící čáry jsou nazývány Stokesovými a anti-Stokesovými liniemi. Stokesovy linie vznikají v případě, kdy je po interakci fotonu s molekulou vyzářen foton o menší energii (vyšší vlnové délce), protože část energie byla spotřebována na zvýšení vibrační energie. Druhý, méně pravděpodobný případ anti-Stokesových linií nastane, když foton převezme vibrační energii od molekuly a vyzáří se foton o větší energii (kratší vlnové délce). Přestože nesou Stokesovy a anti-Stokesovy linie stejnou informaci o frekvenci, v praxi se obvykle využívá pouze měření intenzivnějšího Stokesova rozptylu. Rozdíly v intenzitách jsou dány Boltzmannovou distribucí (Strauch, 1994; Stuart, 2013).

Pro zachycení vibračního Ramanova spektra je nutné, aby došlo ke změně polarizovatelnosti, tj. míra s jakou náročností se vychýlí rozložení náboje, neboli s jakou náročností je prostřednictvím excitovaného záření v molekule indukován dipólový moment. V Ramanově spektru je intenzita pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu (zatímco v IČ spektru je úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu). Měření Ramanova rozptylu závisí stejně jako IČ také na symetrii. Pro molekuly se středem symetrie platí tzv. pravidlo vzájemné vylučnosti, tj. vibrace se středem symetrie, které jsou aktivní v Ramanově spektru, jsou inaktivní v IČ spektru a naopak (Strauch, 1994).

Ramanův rozptyl byl nejprve teoreticky předpovězen Smekalem v roce 1923. Dále ho experimentálně studoval a později i potvrdil a demonstroval indický vědec Sir C. V. Raman (1928), po němž byl jev nazvaný (Nobelova cena 1930). Ke stejnému objevu nezávisle, však o tři měsíce později, dospěli také G. Landberg a L. Mandelshtam v Moskvě (Strauch, 1994; Milata et al., 2008).

Ve snaze zvýšení signálu Ramanova jevu byly vyvinuty některé zesilující techniky. Mezi spektroskopie se zvýšenou citlivostí patří povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), která bude přiblížena v následující kapitole a rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS), která spočívá v excitaci zářením o vlnové délce spadající do absorpčního pásu analyzovaného vzorku. Zesílení efektem RRS je 10^3 – 10^6 násobné (Milata et al., 2008).

2.2.2.1 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Povrchem zesíleným Ramanovým rozptylem (SERS) se rozumí výrazné zesílení Ramanova rozptylu (10^8 – 10^{12} krát) pro molekuly, jež jsou adsorbované na vhodný kovový nanosubstrát. Zesílení bylo poprvé experimentálně zjištěno u pyridinu při jeho adsorpci na zdrsňený povrch stříbrné elektrody v roce 1974. Nejčastěji používanými kovy pro tuto techniku jsou stříbro, zlato nebo měď (Kneipp et al., 2002; Kučková et al., 2018).

Vhodnými a často používanými SERS-aktivními povrchy jsou zlaté a stříbrné koloidy. Příprava probíhá nejčastěji chemickou redukcí dusičnanu stříbrného borohydridem nebo citrátem sodným. Jejich nevýhodou je nestabilita jejich povrchů (koncentrace a typ reziduálních iontů, povrchový potenciál atp.) komplikující reprodukovatelnost získaných výsledků. Z tohoto důvodu jsou perspektivní metody pro přípravu „chemicky čistých“ koloidů laserovou ablací kovu ponořeného do vody za použití pulzního laseru (Procházka, 1997; Kneipp et al., 2002).

Základem zesílení Ramanova rozptylu je adsorpce zkoumané látky na povrch nanočástic. Interakcí elektrického pole s nanočásticemi s menším rozměrem než je vlnová délka dopadajícího záření, dochází k polarizaci elektronů. Polarizace dá vzniku náboji vyvolávajícímu kolektivní oscilace dipolárních povrchových elektronů. Tento efekt klesá se čtvrtou mocninou vzdálenosti analytu od povrchu nanočástice a je tak omezen na povrch nanočástice nebo její těsnou blízkost. Frekvence oscilací povrchových plasmonů jsou známy jako lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance (*LSPR – Localized Surface Plasmon Resonance*), (Kučková et al., 2018).

Vzhledem k tomu, že intenzita Ramanova rozptylu je úměrná druhé mocnině indukovaného dipólového momentu se nabízí dva možné způsoby zesílení, tj. zvýšení elektrického pole adsorbované molekuly nebo zvýšení polarizovatelnosti. Na SERS efektu se tak obecně podílí dva základní mechanismy – elektromagnetický a chemický (Milata et al., 2008).

Elektromagnetický mechanismus díky rezonanční excitaci povrchových plasmonů výrazně zesiluje intenzitu dopadajícího a rozptylovaného záření (faktor zesílení cca 10^4 – 10^6). Tento mechanismus vyžaduje přítomnost nanosubstrátů. Souvisí se změnami elektrického pole na povrchu nanočástice kovu a není tedy

závislý na povaze studované molekuly (záleží však např. na tvaru nanočástic, agregačním stavu apod.). Jde o spřažení oscilující složky elektrického pole excitačního záření a rozptýleného Ramanova záření s oscilacemi povrchového plasmonu na nanočásticích kovu. Je-li elektrické pole rovnoměrně rozprostřeno po celém povrchu částice, tak je na jejich povrchu možné laserem vybudit indukované pole zesilující Ramanův rozptyl. Vodivé elektrony povrchu kovu jsou oscilovány se stejnou frekvencí, jakou má dopadající záření a vytvářejí indukovaný dipól. Vlnová délka laseru musí splňovat podmínku rezonance s povrchovým plasmonem, neboli je potřeba, aby vlnová délka excitačního záření spadala do extinkčního pásu příslušného koloidního systému (Campion a Kambhampati, 1998; Kučková et al., 2018).

Chemický mechanismus (mechanismus molekulární rezonance) zvyšuje polarizovatelnost molekuly. Vzniká v důsledku efektu přenosu náboje nebo tvorby adsorpčního komplexu mezi molekulou a nanočásticí. K využití chemického mechanismu je nutné být v rezonanci s absorpčním pásem zkoumané látky nebo s absorpčním pásem vytvořeného komplexu nanočástice se zkoumanou látkou. V porovnání s elektromagnetickým mechanismem je příspěvek k zesílení signálu mnohonásobně nižší (řádově $10-10^2$). Dle síly interakce mezi molekulou analytu a povrchem kovové nanočástice lze rozlišit fyzisorpci (adsorbát interaguje slabou interakcí na úrovni energií van der Waalových sil) a chemisorpci (adsorbát je vázán silami srovnatelnými s energiemi chemických vazeb), (Milata et al., 2008; Kučková et al., 2018).

V případě, že je uplatněn jak elektromagnetický, tak chemický mechanismus zesílení, neboli když vlnová délka odpovídá vlnové délce povolených elektronových přechodů v molekule a zároveň je v rezonanci s příslušným povrchovým plasmonem, hovoříme o efektu SERRS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*), při kterém lze dosáhnout zesílení konvenčního Ramanova signálu až $10^{14}-10^{15}$ krát (Kneipp et al., 2002; Milata et al., 2008).

Metoda SERS je velmi citlivá a je schopna detekovat látku na úrovni jedné molekuly (Kneipp et al., 2002). Použití je velmi široké a sahá od chemie, mikrobiologie, potravinářství, toxikologie, forenzních věd až po lékařské obory.

V klinické praxi ji lze využít například v biosenzorech k detekci molekul spojených s výskytem rakoviny, Alzheimerovy či Parkinsonovy nemoci (Kučková et al., 2018).

2.3 Vybrané metody studia koloidních soustav

Kromě metod vibrační spektroskopie je ke studiu interakce koloidních soustav využívána také absorpční elektronová spektroskopie v UV-Vis oblasti, dynamický rozptyl světla a měření potenciálu zeta.

2.3.1 UV-Vis absorpce

Podstatou molekulové absorpční spektroskopie v UV-Vis oblasti je měření a interpretace spekter molekul látek absorbujících ultrafialové a viditelné záření v rozsahu vlnových délek 200–800 nm (Milata et al., 2008; Klouda, 2016). Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů (zvláště nevazebných elektronů a π elektronů), které jsou součástí molekulových orbitalů. Měřená spektra odpovídají přechodům elektronů mezi základním a excitovaným stavem molekul vzorku. Vnitřní energie molekuly je dána součtem energie elektronové, vibrační a rotační. Mezi základní a excitovanou elektronovou hladinou je velký energetický rozdíl (10^2 kJ/mol). Nejmenší rozdíl je mezi energiemi hladin rotačních (10^{-2} kJ/mol). Absorpcí fotonu molekula přijme energii, což vede k přechodu elektronu na excitovanou hladinu – jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin. Důsledkem je absorpce fotonů jen o málo se lišících energií a vytváření velmi blízkých absorpčních čar splývajících v pás (Duchoň, 1985; Klouda, 2016).

Jak již bylo zmíněno (kap. 2.2.2.1), dopadem elektromagnetické vlny na částici kovu může docházet ke kolektivním objemovým oscilacím vodivostních elektronů produkujících na povrchu nanočástic šíření vln, označovaných jako lokalizované povrchové plasmony LSPR (Kučková et al., 2018; Liu a Lämmerhofer, 2019). Pro zlato a stříbro jsou pásma LSPR ve Vis oblasti elektromagnetického spektra, a tak jsou stříbrné i zlaté koloidy intenzivně zbarveny. Pásmo LSPR je významně ovlivňováno velikostí, tvarem, agregací nanočástic a celkovým chemickým složením koloidního roztoku. Po agregaci může v důsledku změn v LSPR docházet k výrazné změně zbarvení koloidů, čehož lze využít také pro kolorimetrickou detekci látek (Kučková et al., 2018).

V rámci předložené práce byla UV-Vis spektra měřena pro optimalizaci měření SERS. Zjištění oblasti rezonance napovědělo, zda bude vzorek SERS aktivní nebo bude změřeno pouze konvenční Ramanovo spektrum. Navíc mohou výsledná spektra podat informace i o velikosti a tvaru.

2.3.2 Měření potenciálu zeta

Potenciál na samotném povrchu částic je známý jako Nernstův potenciál, avšak nelze přímo měřit (Bhattacharjee, 2016). Pro popis chemie povrchu pevných materiálů a koloidních soustav je důležitým parametrem elektrokinetický potenciál (zeta potenciál). Generuje se na rozhraní mezi povrchem pevné látky (disperzní fáze) a kapalinou (disperzním prostředím). Zeta potenciál reprezentuje povrchový náboj vznikající v roztoku, kde dochází k disociaci funkčních skupin anebo k adsorpci iontů na povrch (Vilimovská a Voldřich, 2011). Náboj na povrchu částic je hlavní příčinou kinetické stability koloidů. Okolo nabitého povrchu se hromadí opačně nabitě ionty a vzniká iontová sféra (difuzní vrstva). Vrstva iontů těsně přiléhajících k povrchu koloidní částice se pohybuje spolu s částicí a nazývá se Sternova vrstva. Uvnitř iontové sféry je pohybové rozhraní, tzv. hranice skluzu, ve které se pohybují spolu s částicemi pouze některé ionty. Zeta potenciál je potenciál v místě pohybového rozhraní vztažený k hodnotě potenciálu v objemové fázi disperzního prostředí (Atkins a Julio, 2013; Carvalho et al., 2018).

Zeta potenciál je rozhodujícím parametrem pro stabilitu nebo koagulaci (agregaci). Rovnováha mezi procesy disociace a adsorpce je ovlivněna některými faktory. Složení difúzní vrstvy je dynamické a mění se v závislosti na pH, iontové síle a koncentraci. Hodnota pH je pravděpodobně nejvlivnějším parametrem zejména ve vodných disperzích. Když je pH blízko isoelektrického bodu, koloidy ztrácejí stabilitu a aglomerují (flokulují). Se zvyšující se iontovou silou je elektrická dvojvrstva stlačována a zeta potenciál se snižuje. Obdobně platí, že čím vyšší je valence iontů, tím nižší je zeta potenciál. Vztah mezi zeta potenciálem a koncentrací je složitější, obtížně interpretovatelný. Nelze tak poskytnout obecnou směrnici o změně potenciálu v závislosti na koncentraci. Lze však konstatovat, že ve zředěnějších podmínkách dominuje povrchová adsorpce a zeta potenciál roste. Obdobně v koncentrovaném prostředí dominuje silnější elektrická dvojvrstva a projeví se opačný efekt, tj. zeta potenciál klesá (Bhattacharjee, 2016).

Znalosti o zeta potenciálu signifikantně redukuje čas potřebný k optimalizaci podmínek různých procesů. Lze ho použít jako indikátor úspěšného provedení povrchových úprav například k optimalizaci hydrofilnosti povrchu materiálu, která je nezbytným krokem k vysoké biokompatibilitě (Vilimovská a Voldřich, 2011). Je vynikajícím nástrojem k pochopení interakce vláknitých materiálů (interakce s vodou, barvení aj.), (Ramesh Kumar a Teli, 2007). Dále lze použít k vyhodnocení interakcí a stability koloidních systémů v potravinách nebo potravinových doplňcích jako nástroj pro zlepšení biologické dostupnosti účinných látek nebo jako inovace řízeného uvolňování (Cano-Sarmiento et al., 2018).

V rámci předložené práce byl zeta potenciál měřen jako doplňující informace o stabilitě koloidů. Některá literatura klasifikuje absolutní hodnoty zeta potenciálu jako vysoce nestabilní (0–10 mV), relativně stabilní (10–20 mV) středně stabilní (20–30 mV) a vysoce stabilní (>30 mV). Realita je bohužel opět složitější. Není neobvyklé setkat se se stabilními koloidy s nízkým zeta potenciálem a naopak. Stabilita koloidů může být totiž způsobena nejen povrchovým nábojem, ale též stericky díky přítomnosti vhodných organických molekul.

Opakovaným použitím vzorků mohou nanočástice po měření zeta potenciálu kvůli přivedenému napětí degradovat. Při případném znovupoužití vzorku by tak po měření měla být provedena opětovná charakterizace koloidu k vyloučení degradace částic (Bhattacharjee, 2016).

2.3.3 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla, známý také jako fotonová korelační spektroskopie nebo kvazi-elastický rozptyl světla, je metoda sloužící k určení hydrodynamické velikosti nanočástic (Bhattacharjee, 2016). Pro získání informace o velikosti je měřen Brownův pohyb v disperzi, tj. náhodný pohyb částic vznikající v důsledku jejich kolize s molekulami rozpouštědla. Měření se provádí ozáření částic laserem a následnou analýzou fluktuací intenzit rozptýleného světla. Fluktuace intenzit jsou způsobeny konstruktivními a destruktivními interferencemi rozptylu difundujících částic a mění signál v závislosti na rychlosti jejich difúze. Menší částice difundují oproti větším částicím rychleji, což působí rychlejší fluktuace jejich intenzit. Nepřetržitým monitorováním vzorku jsou porovnávány snímky v čase. Korelátor v zásadě měří stupeň podobnosti mezi dvěma signály měřenými po určité době. Na začátku jsou si rozptýlené intenzity velmi podobné, přičemž v čase tuto podobnost v důsledku pohybu částic postupně ztrácí a korelace signálu klesá. U menších částic klesá korelace signálu v důsledku rychlejší difúze rychleji (Bhattacharjee, 2016; Carvalho et al., 2018).

Rychlost Brownova pohybu lze kvantifikovat translačním difúzním koeficientem (značeným D), který po dosazení do Stokesovy-Einsteinovy rovnice umožňuje vypočítat hydrodynamický průměr částic. Dalšími proměnnými, které je nutné znát, jsou viskozita a teplota rozpouštědla (Malvern Panalytical, 2018).

$$d_H = \frac{kT}{3\pi \eta D}$$

d_H hydrodynamický průměr
 k Boltzmannova konstanta
 Tabsolutní teplota
 H viskozita rozpouštědla
 D translační difúzní koeficient

Hydrodynamický průměr je hypotetická hodnota udávající průměr tvrdé koule mající stejný translační difúzní koeficient jako skutečná měřená částice. Tvar ideální koule u koloidních dispergovaných soustav reálně nenalzáme. Složení difúzní vrstvy v průběhu času kolísá v závislosti na iontové síle, molekulách přítomných v prostředí a povaze rozpouštědel (Bhattacharjee, 2016). DLS proto poskytuje pouze přibližnou velikost koloidních částic.

Primárním výsledkem měření je distribuce velikostí částic vyjádřená jako intenzita. Výsledky mohou být dále konvertovány na objemovou nebo početní distribuci. Distribuce velikostí částic vyjádřených intenzitou jsou náchylné k nadhodnocování větších částic. Technika je na větší částice citlivější, neboť se intenzita rozptýleného světla zvyšuje s šestou mocninou průměru částic. K problémům tak dochází zejména v případě silně polydisperzních systémů, kdy částice malých rozměrů nemusí být vůbec detekovány. Konverze intenzit na objem nebo počet poskytují odlišné distribuce, avšak měly by spíše doplňovat údaje o distribucích vyjádřených intenzitami. Slabinou DLS je tak její nízké rozlišení a omezení pro polydisperzní vzorky (Bhattacharjee, 2016; Liu a Lämmerhofer, 2019).

DLS je široce využívanou, rychlou a nedestruktivní metodou vhodnou k odhadu velikosti koloidních částic. Informace o velikosti lze dále využít např. pro rychlé posouzení úspěšnosti nanočásticové syntézy nebo pro získání informací o stabilitě nanočástic v čase (Carvalho et al., 2018; Liu a Lämmerhofer, 2019).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Látky, které byly předmětem experimentu jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: *Studované sloučeniny*

sloučenina	výrobce	čistota uvedena výrobcem %
L-cystein	ROTH	≥ 99
L-cystin	ROTH	≥ 98.5
N-acetyl-L-cystein methylester (NACyM)	FLUKA	≥ 90
N-acetyl-S-phenyl-L-cystein (NAPCy)	SIGMA-ALDRICH	≥ 98
taurin	SIGMA-ALDRICH	≥ 99

- ultračistá deionizovaná voda čištěná systémem Mili-Q
- ethanol 99.8% určený pro UV spektroskopii (Lach:Ner)
- dusičnan stříbrný (Sigma–Aldrich)
- kyselina tetrachlorozlatitá (Sigma–Aldrich)
- tetrahydroboritan sodný (Sigma–Aldrich)
- kyselina chlorovodíková (Penta)
- kyselina dusičná (Penta)

3.2 Příprava zásobních roztoků

Látky uvedené v Tab. 1 byly rozpuštěny v ultračisté deionizované vodě pro přípravu 10mM zásobních roztoků. V případě N-acetyl-L-cysteinu methylesteru (NACyM) bylo k rozpuštění nutné roztok zahřát na 30–40 °C na magnetické míchačce s topnou deskou. L-cystin a N-acetyl-S-phenyl-L-cystein (NAPCy) se ani po zahřátí (30–40 °C) rozpustit nepodařilo. NAPCy byl proto rozpuštěn ve směsi voda : ethanol v poměru 1 : 1 (pro 10 mM zásobní roztok). Z důvodu snahy připravit také vzorky NAPCy bez přítomnosti ethanolu bylo postupným přidáváním vody (po 500 µl) k 10mM roztoku s nerozpuštěným NAPCy zjištěno, že hranice rozpustnosti NAPCy v deionizované vodě je při koncentraci 5.55 mM. Používaná koncentrace zásobního roztoku bez ethanolu byla upravena na 5 mM.

3.3 Stříbrné a zlaté koloidy

Pro část experimentů byly použity již připravené koloidní roztoky. V závorce je uveden měsíc a rok syntézy. Příprava obdržených koloidů je ve stručnosti uvedena v Příloze A.

borohydridový koloid: stříbrný AgBhIV (6/2017)
zlatý AuBhII (6/2017)

hydroxylaminový koloid: stříbrný AgHAC (10/2017)

citrátový koloid: stříbrný AgCitr (6/2017)
zlatý AuCitrLM (6/2017)

Dále byly syntetizovány také vlastní roztoky stříbrných a zlatých koloidů (viz Obr. 8), které byly označovány AgBhIV 2019 a AuBhII 2019. Pro jejich přípravu byla zvolena chemická redukce stříbrné nebo zlatité soli za použití chlazeného borohydridu sodného jakožto redukčního činidla. Příprava nově syntetizovaných koloidů byla ve shodě s přípravou obdržených borohydridových koloidů AgBhIV a AuBhII, rozdílem byla pouze odchylka v navážce hydrokropického borohydridu sodného uvedena (Příloha A).



Obr. 8 Syntetizované roztoky zlatého (AuBhII 2019, vlevo) a stříbrného (AgBhIV 2019, vpravo) koloidu

3.3.1 Příprava stříbrného borohydridového koloidu AgBhIV

Stříbrný borohydridový koloid byl připraven v ledové lázni vychlazené na 4 °C. V 75 ml vychlazené deionizované vody bylo rozpuštěno 3.47 mg borohydridu sodného. Za stálého míchání (1200 rpm) bylo k roztoku po kapkách v pravidelném intervalu přidáváno 7.5 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci 2.2 mM. Po 4 min od poslední kapky dusičnanu byla odstraněna ledová lázeň a roztok vymícháván na pokojovou teplotu (cca 45 min).

3.3.2 Příprava zlatého borohydridového koloidu AuBhII

Zlatý borohydridový koloid byl připraven v ledové lázni vychlazené na 4 °C. V 75 ml vychlazené deionizované vody bylo rozpuštěno 3.51 mg borohydridu sodného. Za stálého míchání (1200 rpm) bylo k roztoku po kapkách v pravidelném intervalu přidáváno 9 ml vodného roztoku tetrachlorozlatitanu o koncentraci 2.2 mM. Po 4 min od poslední kapky tetrachlorozlatitanu byla odstraněna ledová lázeň a roztok vymícháván na pokojovou teplotu (cca 45 min).

3.3.3 Příprava vzorků

Pro každou zkoumanou látku byly všechny systémy s koloidy připravovány ve dvou finálních koncentracích příslušné zkoumané látky, tj. 0.1 mM a 1 mM. Některé systémy byly připravovány také v koncentraci 0.5 mM. Čištění křemenných kyvet bylo po znečištění stříbrnými koloidy zajišťováno kyselinou dusičnou s destilovanou vodou v poměru 1 : 1 a lučavkou královskou (kyselina chlorovodíková : kyselina dusičná v poměru 3 : 1) po znečištění kyvet zlatými koloidy.

3.4 Měření infračervené absorpce

Měření infračervených spekter bylo provedeno na přístroji Nicolet™ iS™ 5 FTIR od firmy Thermo Scientific metodou úplného zeslabeného odrazu (ATR, *Attenuated Total Reflection*). Měřeny byly pevnolátkové – krystalické vzorky studovaných látek. Po umístění zkoumané látky na krystal byl vzorek přitlačen přítlačovým šroubem. Měření probíhalo v rozsahu $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 2 cm^{-1} prostřednictvím softwaru OMNIC. Měření probíhalo v laboratoři na Katedře biofyziky.

3.5 Měření absorpce (extinkce) v UV-Vis oblasti

Extinkční spektra vzorků byla měřena na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord Plus 250 (od firmy Analytik Jena) s chlazeným polovodičovým detektorem. Spektra byla měřena v rozsahu $190\text{--}1100\text{ nm}$, rychlostí 20 nm/s a s rozlišením 1 nm . Šířka štěrbinu monochromátoru byla nastavena na 2 nm . Měření probíhalo v laboratoři na Katedře biofyziky.

Pro vzorky byla použita křemenná kyveta s optickou dráhou 1 cm . Kyveta byla naplněna objemem 1 ml vzorku. Po změření samotného koloidu následovalo měření extinkce koloidu smíchaného s roztokem cysteinu nebo ostatních derivátů. Z důvodu ověření a reprodukovatelnosti získaných dat byla měření prováděná nejméně třikrát.

3.6 Měření Ramanova rozptylu a SERS

Měření Ramanova rozptylu a SERS byla prováděna na dvou odlišných Ramanových spektrometrech.

Na katedře biofyziky byla měřena spektra pomocí přístroje ProRaman-L (TSI ChemLogix) s excitační vlnovou délkou laseru 785 nm . Vzorky byly umístovány do držáku pro vzorky ve skleněných vialkách. Výkon laseru při měření byl nastaven na 300 mW a signál byl snímán s 1 s expozicí $60\times$.

Na katedře optiky byl použit sestavený spektrometr upevněný na optickém stole s excitační vlnovou délkou laseru 532 nm . Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách s antireflexním pokrytím o průřezu $3 \times 4\text{ mm}$ a o objemu $70\text{ }\mu\text{l}$. Experimentální data byla sbírána za různých akumulčních časů a při různých

excitačních energiích. Pomocí expoziční doby a excitační energie byl vypočítán výkon laseru na konkrétní vzorek.

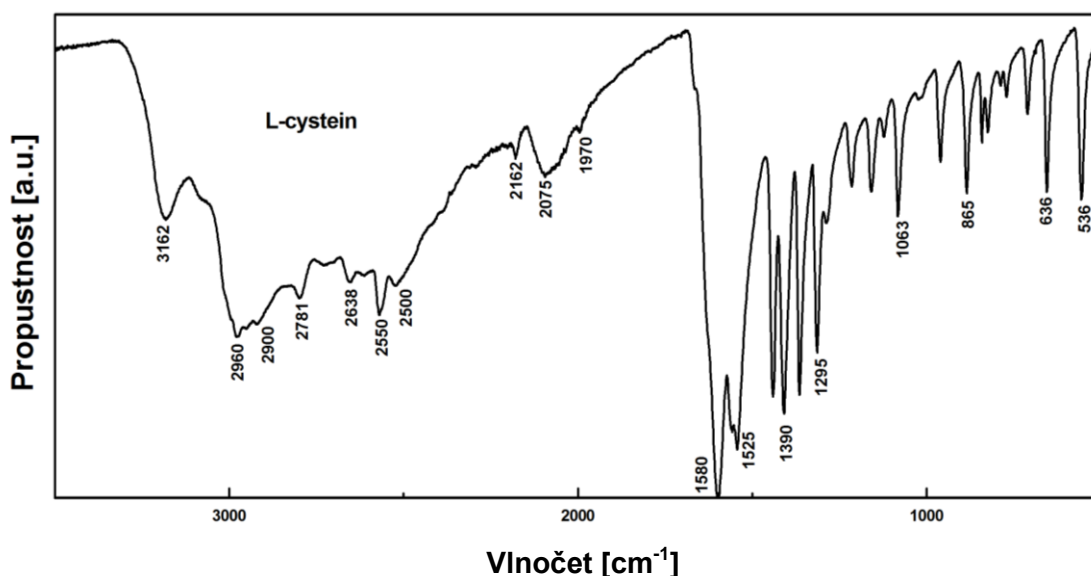
3.7 Měření DLS a zeta potenciálu

Měření DLS a měření zeta potenciálu bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano Series od firmy Malvern. Měření probíhalo v laboratoři na Katedře biofyziky. Pro měření DLS byla naplněna plastová kyveta objemem 1 ml vzorku. Měření byly získány hodnoty distribuce velikostí částic koloidních systémů. Pro měření zeta potenciálu byla použita měřící cela s elektrodami, která byla naplněna 750 μ l vzorku. Výsledkem měření jsou hodnoty zeta potenciálu pro příslušný vzorek.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Cystein a jeho deriváty v pevném skupenství měřené prostřednictvím IČ absorpce

U studovaných pevnolátkových sloučenin bylo provedeno měření IČ absorpce. Ve spektrech byl očekáván zejména výskyt příslušných vibračních skupin lišící se v jednotlivých derivátech. Infračervené spektrum je charakteristické pro jednotlivé látky natolik, že prakticky neexistují dvě sloučeniny se zcela shodným spektrem. K identifikaci neznámé sloučeniny se tak využívají atlasy spekter a shoda zejména v oblasti otisku prstů. V rámci předložené práce byly používány známé látky, a tak bylo cíleno zejména na oblast charakteristických vibračních pro ověření přítomnosti nebo nepřítomnosti funkčních skupin pomocí literatury a tabulek vlnočtů. Při měření IČ absorpce L-cysteinu (viz Obr. 9), bylo dle chemické struktury molekuly očekáváno zachycení vibračních thiolové skupiny (**SH**), aminoskupiny (**NH**), alifatických uhlovodíků (**CH**), karbonylové (**C=O**) a alkoholové (**OH**) skupiny od karboxylu.

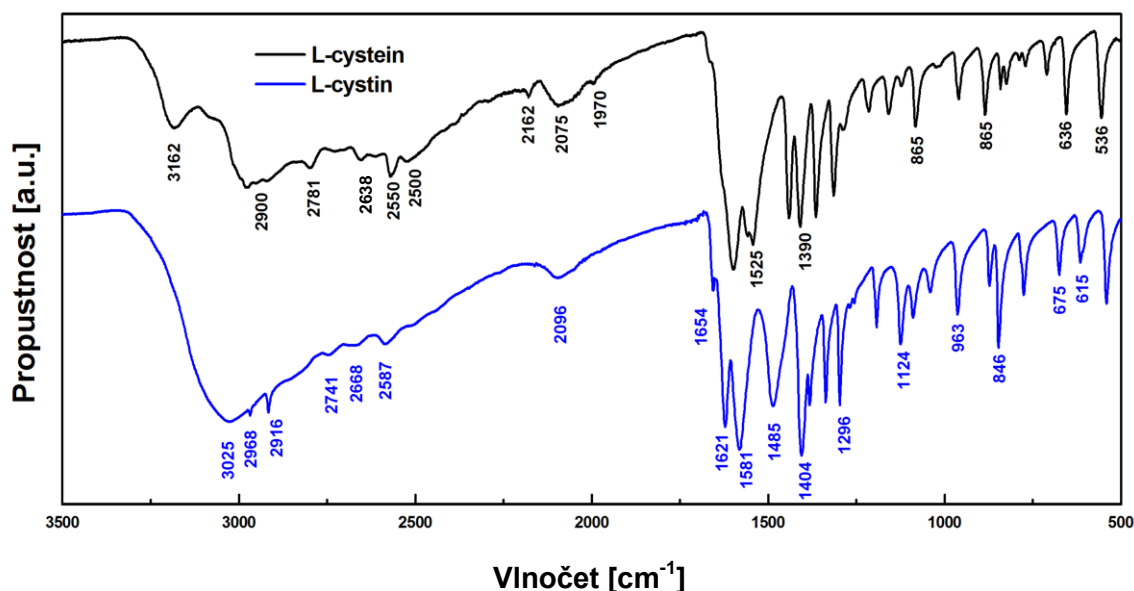


Obr. 9: IČ absorpční spektrum L-cysteinu

Spektru L-cysteinu, dominuje silný absorpční pás v oblasti **1580 cm⁻¹**. Jedná se o oblast patřící vibračním skupiny **C=O**, které jsou ve spektru organických molekul v důsledku silné polární vazby nesoucí dipólový moment jedněmi z nejintenzivnějších vibračních vůbec. V oblasti **3400–2400 cm⁻¹** lze pozorovat široký pás absorpce od **OH** skupiny z karboxylové skupiny. Široké absorpci v této oblasti přispívají také **NH** vibrace, což vede k nejednoznačnému odlišení **NH** a **OH**

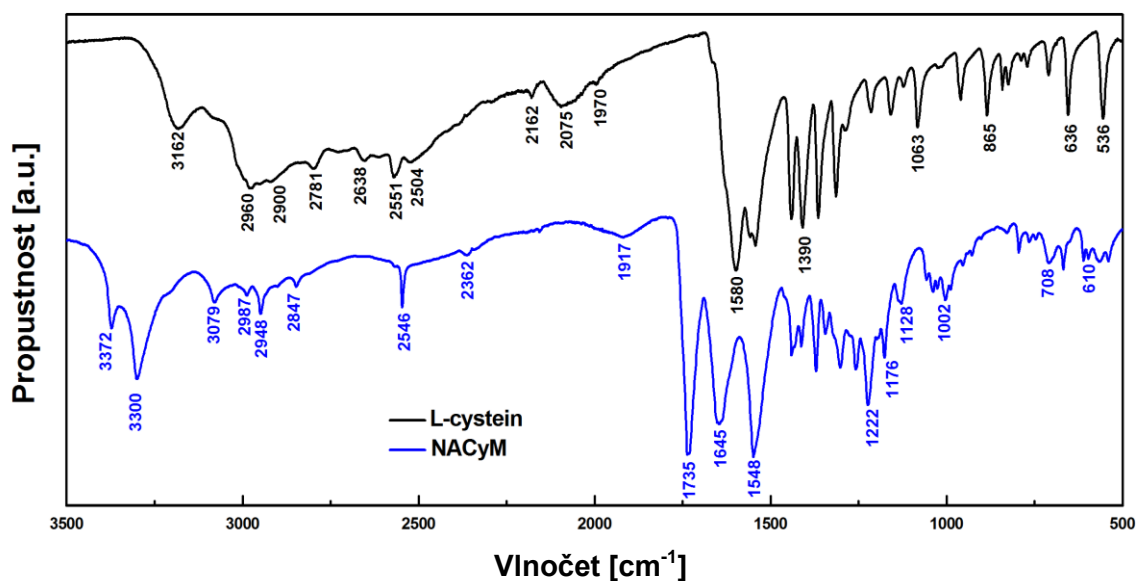
vibrací. Oblast okolo 3000 cm^{-1} přísluší **CH** vibracím, u kterých lze dále specifikovat, že se nejedná o izolované **CH** vibrace, ale o uhlovodíky na alifatickém řetězci. Přiřazen byl také očekávaný pás **SH** vibrace v oblasti 2550 cm^{-1} (Kováč a Leško, 1980; Kania, 2007). Parker (2013) provedl pro molekulu L-cysteinu *ab initio* výpočty vlnočtů pro různé vibrační techniky a uvádí, že pás 3162 cm^{-1} , 2638 cm^{-1} a 2960 cm^{-1} přísluší **NH** vibracím.

Další měřenou látkou IČ absorpcí byl L-cystin (viz Obr. 10). Jak již bylo uvedeno v teoretické části, cystin je dimerní struktura vzniklá oxidací cysteinu, proto byla ve srovnání s L-cysteinem očekávána absence vibrace **SH** skupiny v oblasti okolo $2550\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$. Ve spektru cystinu je však vibrace, která pravděpodobně **SH** vibraci přísluší (2587 cm^{-1}). Možným vysvětlením může být nedostatečná čistota cystinu. Ve shodě s cysteinem lze ve spektru dále pozorovat pásy od **OH** z karboxylové skupiny (3025 cm^{-1}), pásy od uhlovodíků na alifatickém řetězci (2968 a 2916 cm^{-1}) i pásy od karbonylové skupiny (1581 cm^{-1}). Na rozdíl od L-cysteinu nebyla u cystinu pozorována **NH** vibrace v oblasti 3162 cm^{-1} . (Kováč a Leško, 1980, Kania, 2007)



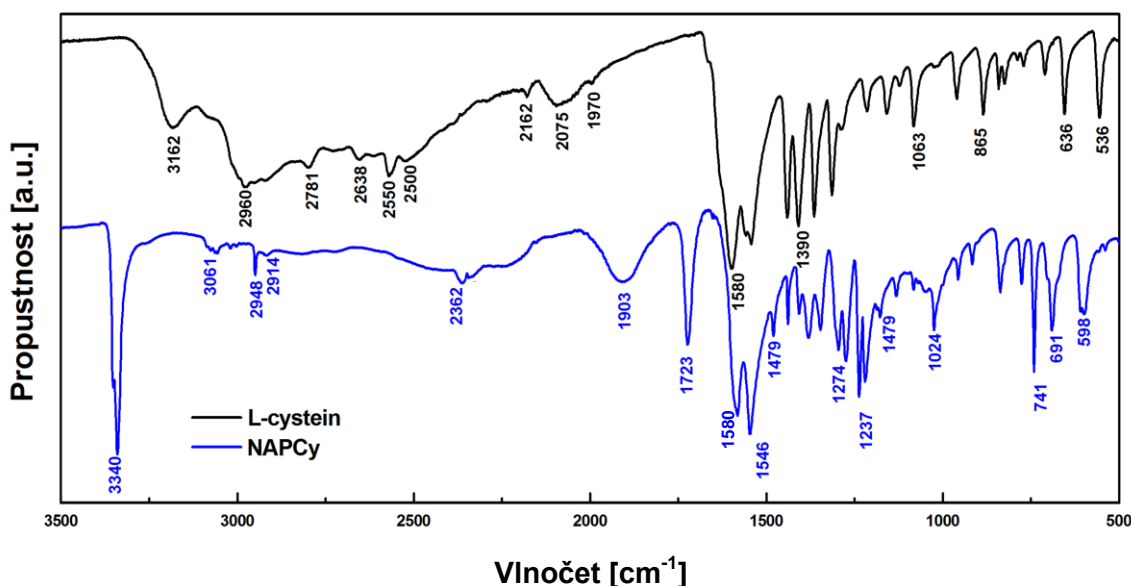
Obr. 10 Srovnání IČ absorpčních spekter L-cysteinu a L-cystinu

V případě NACyM (viz Obr. 11), lze dle očekávání sledovat, že ve srovnání s L-cysteinem ve spektru není přítomen pás od karboxylové skupiny, a tak je zřejmé, že pásy **3372** a **3300 cm^{-1}** přísluší pouze skupině **NH**. Dále lze ve shodě s L-cysteinem pozorovat vibrace alifatických uhlovodíků v oblasti **2850–3000 cm^{-1}** a **SH** vibraci v oblasti **2546 cm^{-1}** . Velmi intenzivní vibrace při **1735 cm^{-1}** přísluší **C=O** skupině, která je oproti L-cysteinu, posunutá k vyšším vlnočtům. Stalo se tak v důsledku indukčního efektu esterové skupiny, která má oproti karboxylové skupině vyšší silovou konstantu.



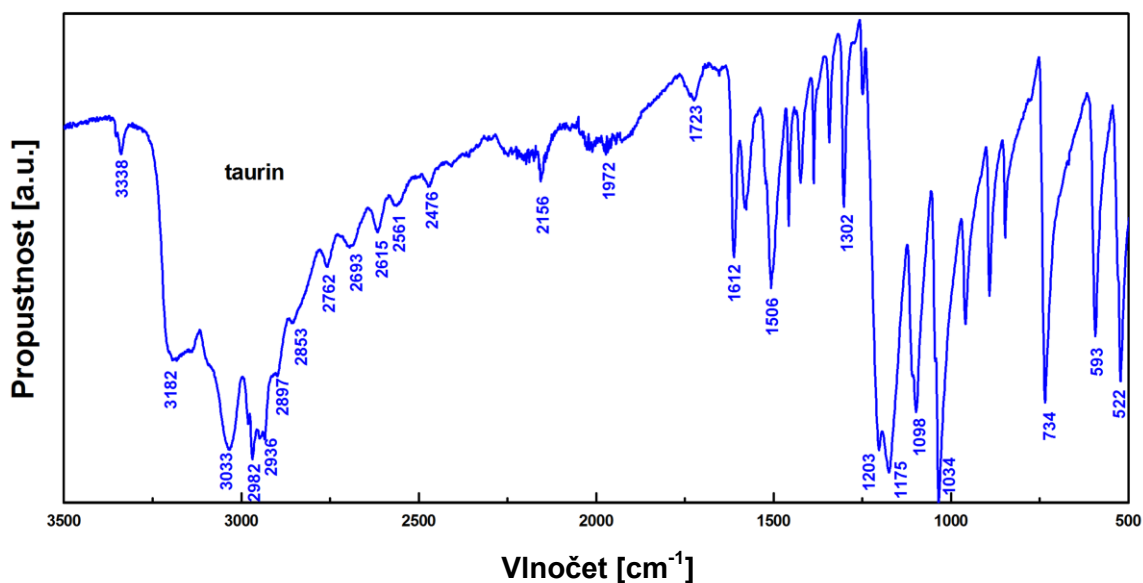
Obr. 11 Srovnání IČ absorpčních spekter L-cysteinu a NACyM

Z IČ spektra NAPCy (viz Obr. 12), je zřejmé, že ve spektru při srovnání s L-cysteinem chybí **SH** vibrace v oblasti 2550 cm^{-1} , neboť molekula NAPCy má přes síru navázaný fenyl. Intenzivní úzký pás v oblasti 3340 cm^{-1} přísluší vibračním skupiny **NH**. V oblasti 2948 a 2914 cm^{-1} lze ve shodě s L-cysteinem pozorovat vibrace od uhlovodíkových alifatických řetězců, zatímco v oblasti 3061 cm^{-1} jsou zachyceny vibrace dvojných vazeb uhlovodíků z aromátu. Oblast 1723 cm^{-1} přísluší volné karboxylové skupině. V oblasti 1580 cm^{-1} je vibrace karboxylové skupiny pocházející od acetylu, na rozdíl od L-cysteinu, kde je **C=O** vibrace od karboxylové skupiny. Pásky v oblasti 2362 cm^{-1} vznikly v důsledku zachycení oxidu uhličitého ze vzduchu v důsledku jejich neúplného odečtu (resp. staršího změření základní linie).



Obr. 12 Srovnání IČ absorpčních spekter L-cysteinu a NAPCy

Poslední látkou, u níž byla měřena IČ absorpce byl taurin, který je degradačním produktem L-cysteinu. Z důvodu velkých strukturních odlišností není porovnáván s L-cysteinem jako předchozí deriváty. Ve spektru (Obr. 13), lze pozorovat **NH** vibrace v oblasti 3338 cm^{-1} . Absorpce poblíž 3182 cm^{-1} svědčí o přítomnosti vodíkových můstků skupiny **OH**. Pásky v blízkosti 2900 cm^{-1} přísluší alifatickým **CH** vibracím. Dále lze pozorovat kombinační pásky a overtóny charakteristické pro sulfonovou skupinu v oblasti $2750\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ (Kania, 2007; Moreira et al., 2018).

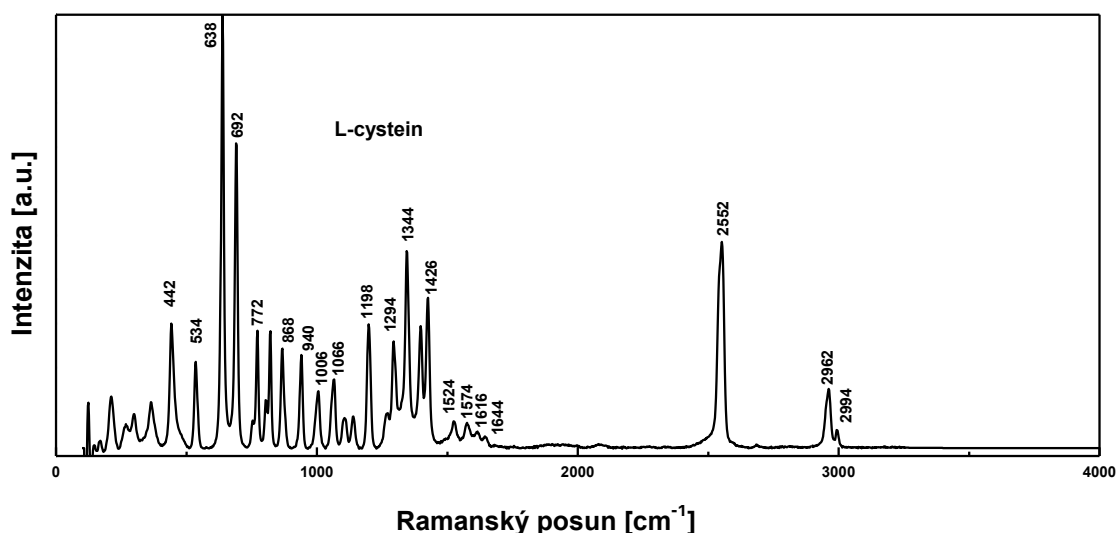


Obr. 13 IČ absorpční spektrum taurinu

4.2 Cystein a jeho deriváty v pevném skupenství a v roztoku měřené prostřednictvím Ramanova rozptylu při excitaci 785 nm

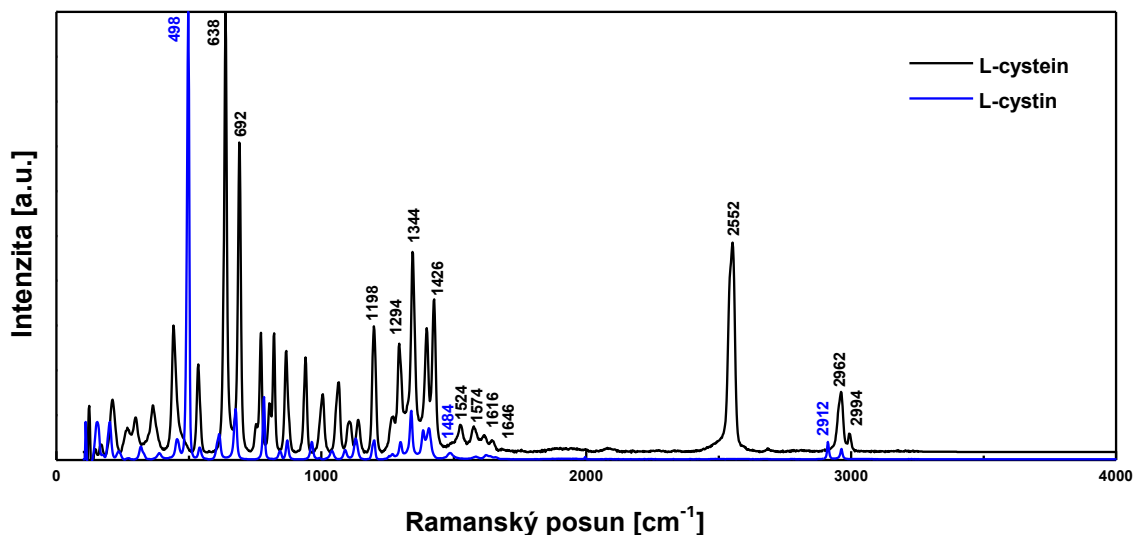
Interpretace Ramanových spekter je obdobná jako interpretace spekter IČ. Vibrační frekvence jednotlivých módů molekul jsou nezávislé na tom, zda jsou studovány Ramanovou nebo IČ spektroskopií, avšak intenzity spektrálních linií jsou pro obě techniky odlišné vzhledem k rozdílným výběrovým pravidlům a fyzikálním principům obou spektroskopií. Ramanovo spektrum je jednodušší než spektrum IČ, neboť nemá vibrace vyššího řádu. Měření Ramanova rozptylu bylo provedeno z důvodu identifikace charakteristických pásů funkčních skupin studovaných látek.

Nejprve byla měřena spektra látek v pevném skupenství. Ve spektru L-cysteinu (viz Obr. 14), se v oblasti 2994 a 2962 cm^{-1} nachází pásy **CH** vibrací. Přiřazen byl také očekávaný pás **SH** skupiny v oblasti 2552 cm^{-1} . Parker, (2013) uvádí *ab initio* výpočty, ve kterých ozřejmil další pásy. Pás 1644 cm^{-1} přísluší asymetrickým **C=O** vibracím. V oblasti $1616\text{--}1524\text{ cm}^{-1}$ se nachází asymetrické i symetrické **NH** vibrace. Spektru dominuje pás 638 cm^{-1} , který poskytuje informaci o přítomnosti vazby **CH-CO₂**. Druhý nejintenzivnější pás spektra s vlnočtem 692 cm^{-1} značí přítomnost **C-S** vazby. V oblasti 442 cm^{-1} se nachází pás vazby **CH₂-CH-SH**.



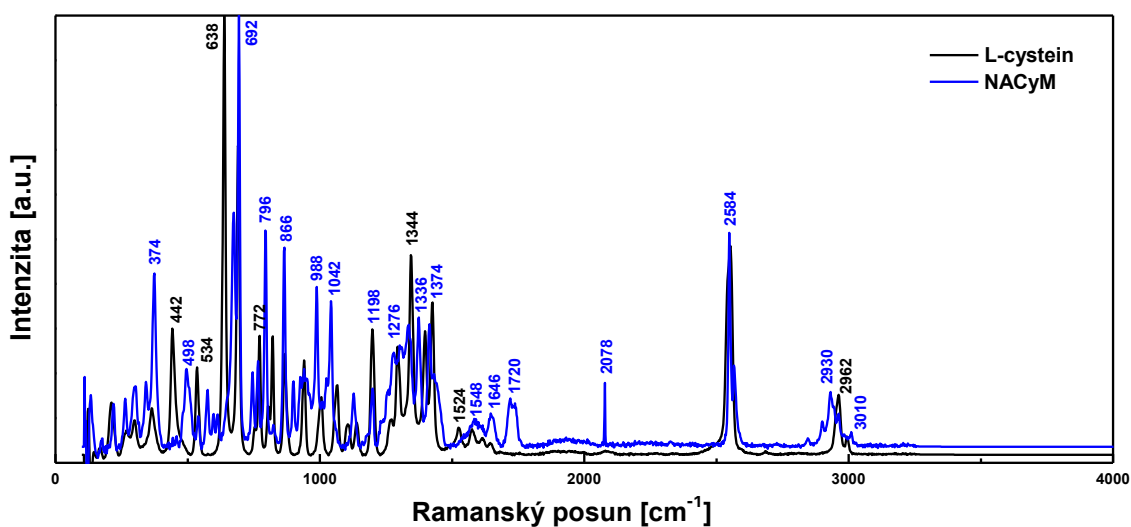
Obr. 14 Ramanovo spektrum L-cysteinu

Další látkou měřenou prostřednictvím Ramanova rozptylu byl cystin (Obr. 15). Ve srovnání s L-cysteinem je evidentní absence **SH** vazby v oblasti **2552 cm⁻¹**. Oblast kolem **2900 cm⁻¹** lze přiřadit **CH** alifatickým vibracím. Nejintenzivnější pás poskytuje disulfidová **S-S** vazba v oblasti **498 cm⁻¹** (Bazylewski et al., 2017).



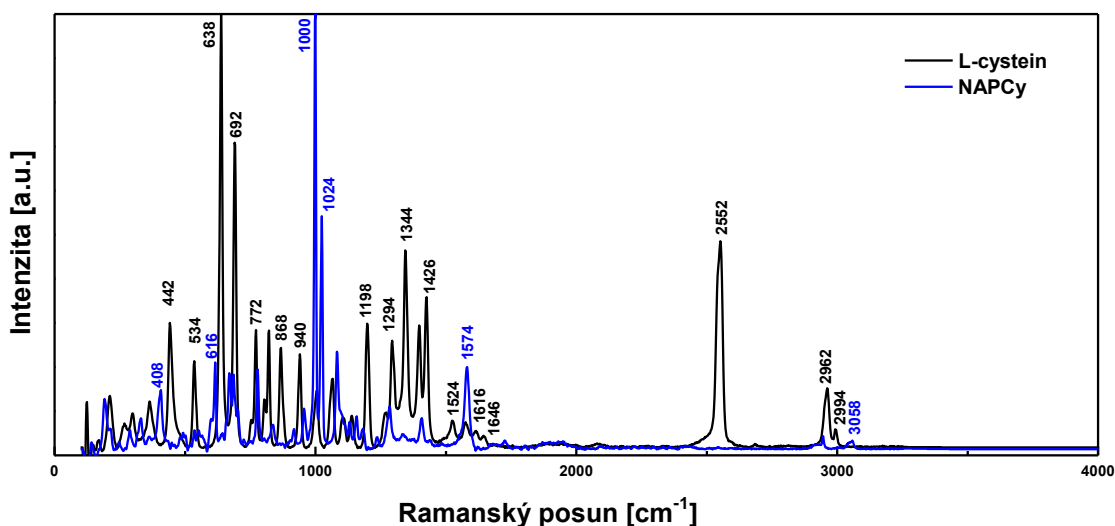
Obr. 15 Srovnání Ramanova spektra L-cysteinu a cystinu

Ramanovým spektrometrem byl měřen také NACyM (viz Obr. 16). V oblasti **2930 cm⁻¹** se nachází **CH** vibrace. Dále je přítomna ve shodě s cysteinem **SH** vibrace s pásem **2584 cm⁻¹**. Pásky **1646 cm⁻¹** a **1720 cm⁻¹** přísluší skupině **C=O**. Ve shodě s L-cysteinem je přítomna vazba **C-S** v oblasti **692 cm⁻¹** (Parker, 2013; Picot et al., 2019). Úzký pás **2078 cm⁻¹** je typickým zachycením kosmického záření, tzv. spike.



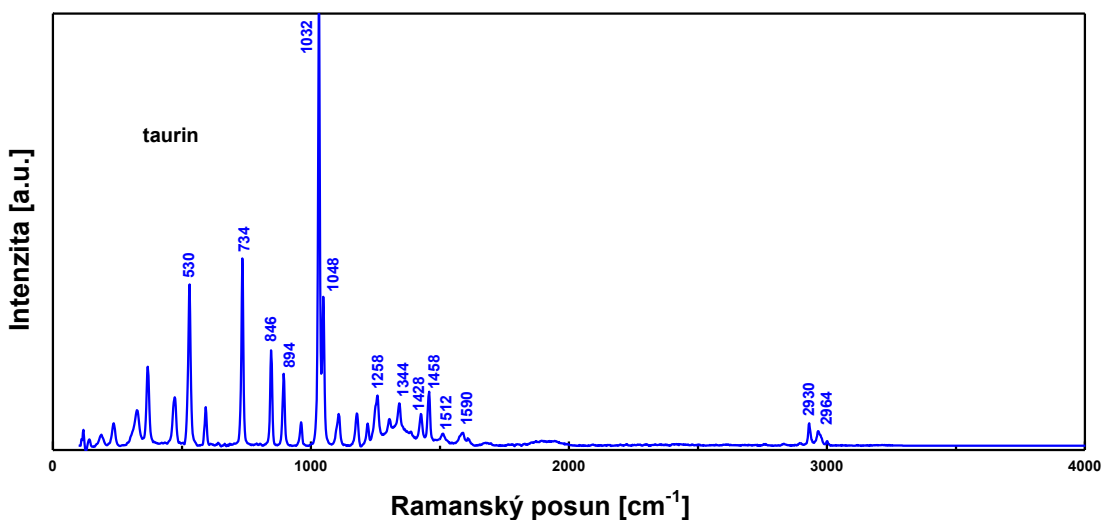
Obr. 16 Srovnání Ramanova spektra L-cysteinu a NACyM

Na Obr. 17 je Ramanovo spektrum NAPCy. Ve srovnání s L-cysteinem lze očekávat pozorovat absenci **SH** skupiny, která je „kryta“ fenylem. O přítomnosti fenylu svědčí velmi intenzivní, tzv. dýchací, vibrace v oblasti 1000 cm^{-1} . Dále jsou přítomny aromatické i alifatické **CH** vibrace v oblasti okolo 3000 cm^{-1} .



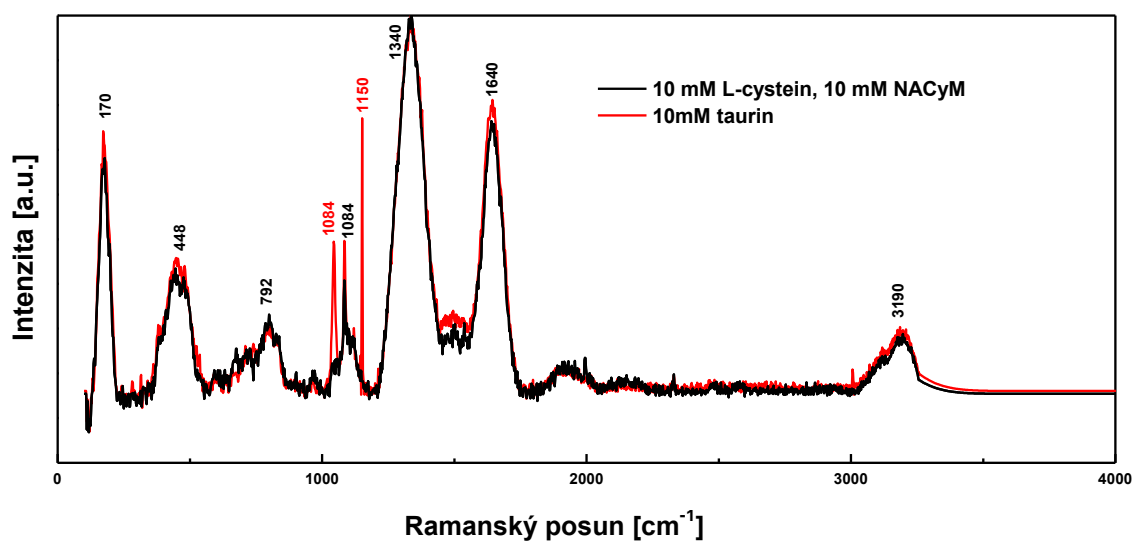
Obr. 17 Srovnání Ramanova spektra L-cysteinu a NAPCy

Ramanovu spektru taurinu (viz Obr. 18), dominuje pás 1032 cm^{-1} , který stejně jako pás 530 cm^{-1} přísluší skupině SO_3 . Oblast 734 cm^{-1} svědčí o přítomnosti vazby C-S a CH_2 . Pás 1258 cm^{-1} patří vibracím CH_2 a SO_3 . Oblast 1590 cm^{-1} lze přiřadit NH vibracím. Opět lze vidět také pásy CH v oblasti pod 3000 cm^{-1} (Moreira et al., 2018).



Obr. 18 Ramanovo spektrum taurinu

Výhodou Ramanovy spektroskopie je možnost měření ve vodném roztoku, neboť voda má malý účinný průřez. Zachycení spekter látek v roztoku by bylo vhodné z důvodu měření SERS, při kterém byly používány nanočástice, jež jsou nativní ve vodném roztoku, a u kterých zkoumáme interakce ionizovaných látek. Signál látek molekul v roztoku byl však při daném výkonu a excitaci zachycen pouze slabě. Ve spektrech 10mM zásobních roztoků, vždy převažovaly pásy rozpouštědla, tedy vody, případně ethanolu. L-cystein, NACyM i taurin, (viz Obr. 19) měly oproti pásům typickým pro vodu navíc široký pás v oblasti 1340 cm^{-1} a úzký pás 1084 cm^{-1} . Pás v oblasti 1340 cm^{-1} lze pozorovat také u pevnolátkových měření a dle Parker (2013) přísluší symetrickým CO_2 vibracím. V případě taurinu byly zachyceny také pásy 1084 a 1150 cm^{-1} , které jsou zřejmě od skupiny SO_3 . Při měření zásobního roztoku NAPCy, rozpuštěného ve směsi ethanol : voda, byly pozorovány pouze pásy ethanolu.



Obr. 19 Ramanovo spektrum 10mM zásobních roztoků L-cysteinu, NACyM a taurinu. Excitace laseru 785 nm.

4.3 Interakce studovaných látek s koloidy

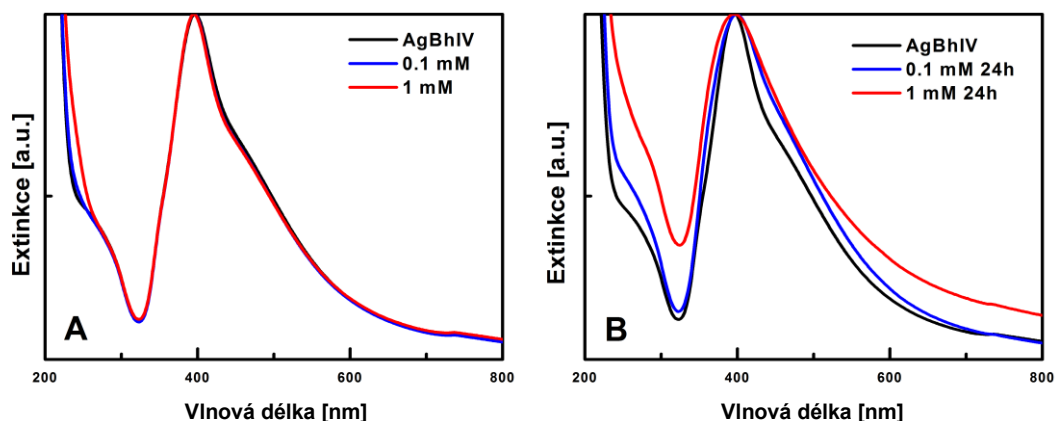
Sledováním interakce studovaných látek se stříbrnými a zlatými koloidy bylo zjišťováno, zda se deriváty adsorbují na povrch nanočástic a zda je možné zachytit jejich signál metodou SERS. V případě zachycení SERS signálu bylo dále cílem usoudit, jakým způsobem je sloučenina k částici navázaná. U vybraných látek by se pak jednalo o zjištění, zda je adsorbát na kov ve vazbě **Ag-OOC (Au-OOC)**, **Ag-N (Au-N)** nebo **Ag-S (Au-S)**. Měření UV-Vis spekter poskytlo první informaci o tom, do jaké míry ovlivní přidání derivátů původní vlastnosti příslušného koloidu a zda bude možno měřit SERS spektra pomocí dostupných vlnových délek laserů. Pomocí DLS a zeta potenciálu, bylo ověřováno, zda přidání látky ovlivní velikost a agregační stav částic a zda se potvrdí průběh UV-Vis spekter. Ramanův rozptyl byl měřen s excitační vlnovou délkou laseru 785 nebo 532 nm, a to zejména na vybraných systémech, jež měly UV-Vis spektra perspektivní pro zachycení SERS dostupnými laserovými excitacemi.

4.3.1 Interakce L-cysteinu sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu

4.3.1.1 Interakce L-cysteinu se stříbrnými koloidy

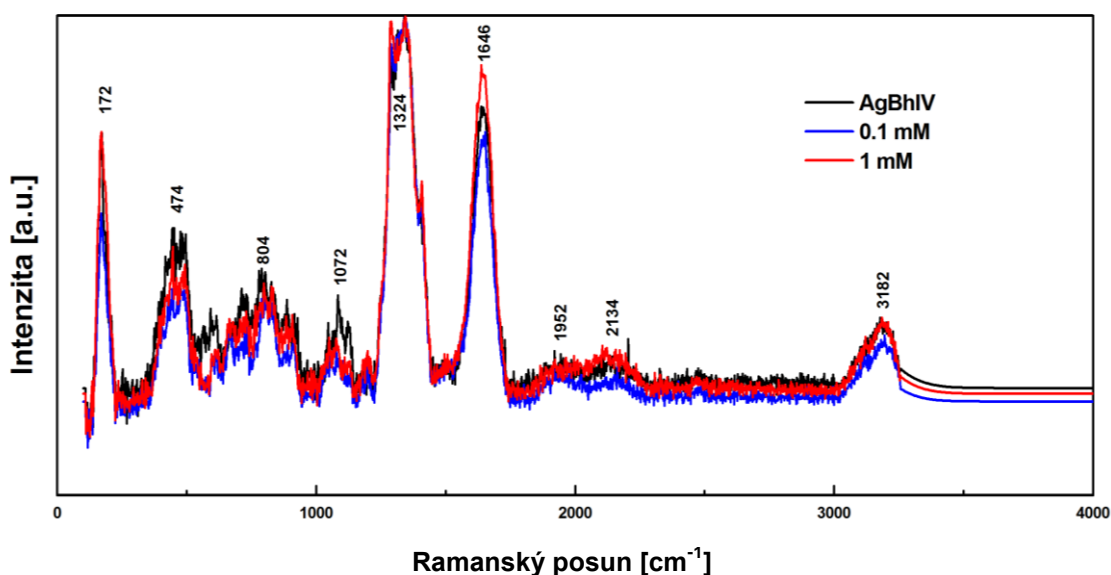
Interakce L-cysteinu byla sledována se čtyřmi různými koloidy stříbra. Borohydridové koloidy jsou z hlediska zkoumání adsorbátu výhodné, neboť nemají příliš rigidní obálku, která by bránila kontaktu adsorbátu s kovovým povrchem. U staršího koloidu z roku 2017 lze předpokládat, že povrch částic bude obklopen polyboráty, a že se jedná o stabilní neagregovaný systém. Při interakci koloidu s látkou se molekula může buď vmezeřit a navázat přímo na kovový povrch nebo se pouze elektrostaticky přiblížit k iontové obálce. Způsob interakce velmi závisí na čase uplynulém od vytvoření nanočástic, typu a na koncentraci molekul tvořících obálku.

Z extinkce (tj. součet příspěvku absorpce a příspěvku rozptylu) spektra borohydridového koloidu (viz Obr. 20) vyplývá, že po přidání molekuly L-cysteinu ve dvou koncentracích došlo po 24 h ke změně agregačního stavu částic, přičemž více agregoval systém o vyšší koncentraci L-cysteinu. Přidaná látka se tak přiblížila k povrchu nanočástice, čímž byla změněna elektrická dvojrůzstva a došlo k překročení agregační bariéry.



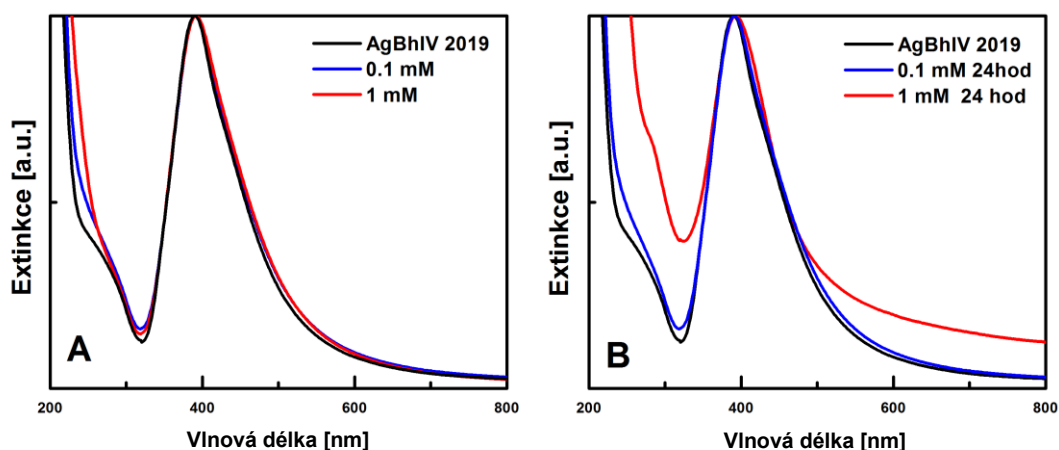
Obr. 20 Extinkční spektrum *L*-cysteinu ve dvou finálních koncentracích v interakci se starším borohydridovým koloidem AgBhIV. A – měřeno ihned po přidavku *L*-cysteinu, B – měřeno po 24 h.

Systém byl změřen na Ramanově spektrometru s excitací 785 nm. Agregace systému o koncentraci 1 mM zasahovala až do oblasti 785 nm, avšak nedošlo k vytvoření druhotného maxima, a proto SERS zesílení nebylo detekováno. Ve spektru bylo změřeno pouze Ramanovo spektrum vody a složek koloidu, (viz Obr. 21). Z výsledku plyne, že se molekula nedostala dostatečně blízko k povrchu, a že mírná agregace pozorovaná v UV-Vis spektrech není vždy zárukou SERS aktivity systému při použití excitace 785 nm.



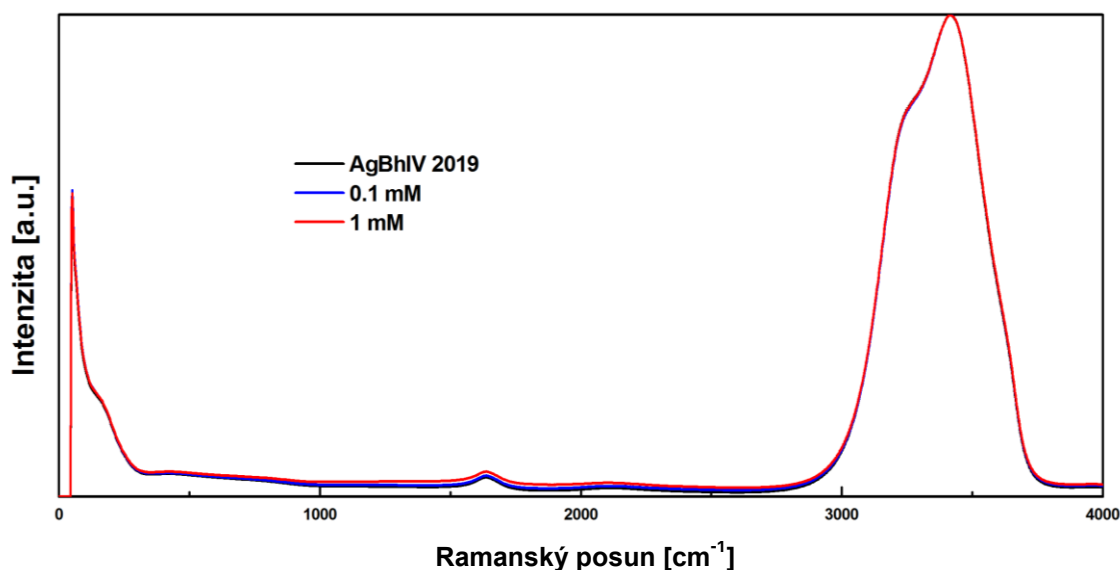
Obr. 21 Srovnání Ramanových spekter systémů *L*-cysteinu o dvou finálních koncentracích s koloidem AgBhIV. Excitace 785 nm, SERS signál nedetekován.

Další interakce L-cysteinu byly zkoumány s čerstvě syntetizovaným borohydridovým koloidem. U čerstvých borohydridových koloidů lze předpokládat nezralost systému a povrch částic obklopený boráty (nikoliv polyboráty). V extinkčním spektru, (viz Obr. 22), měla agregace obdobný trend a ve srovnání se starším borohydridovým koloidem se rozdíl neprojevil. Připraveny byly také systémy o koncentraci 0.5 mM, které měly obdobný agregační trend.



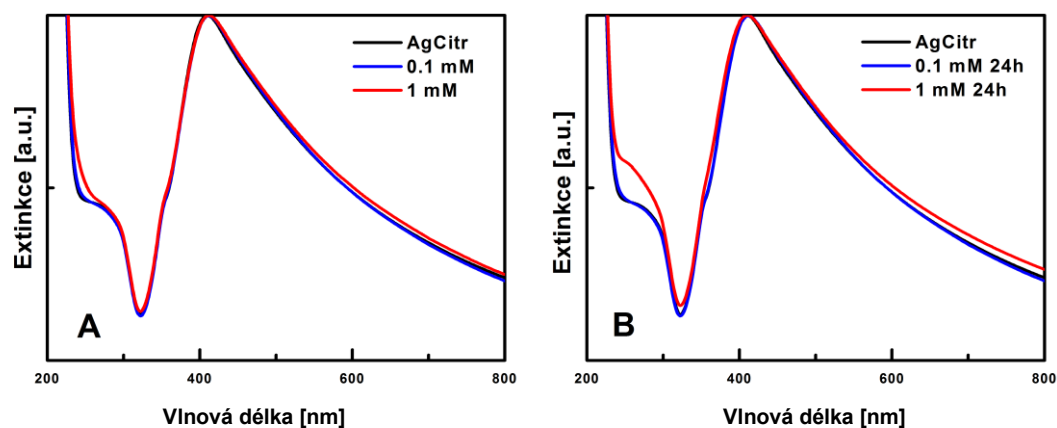
Obr. 22 Extinkční spektrum L-cysteinu ve dvou finálních koncentracích v interakci s čerstvým borohydridovým koloidem AgBhIV 2019. A – měřeno ihned po přidavku L-cysteinu, B – měřeno po 24 h.

Systém byl změřen na Ramanově spektrometru s excitací laseru 785 nm i 532 nm (Obr. 23), kde obdobně jako u staršího borohydridového koloidu nebylo SERS spektrum zachyceno.



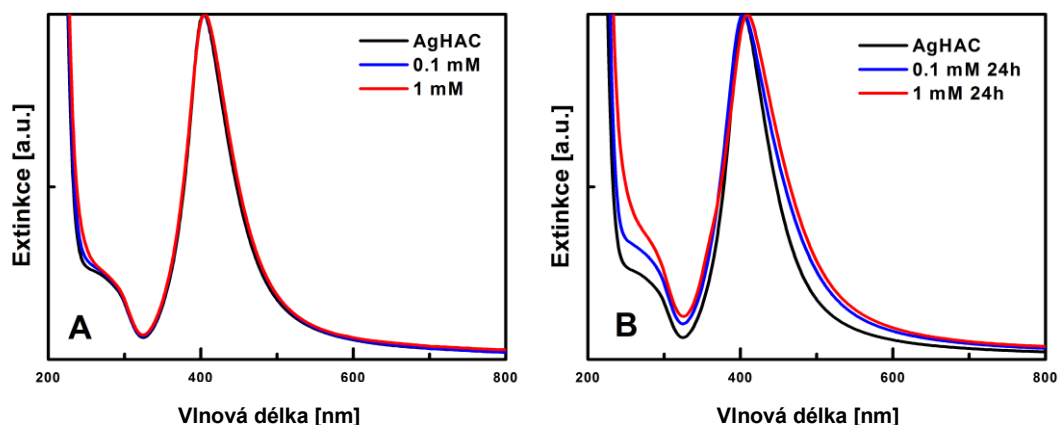
Obr. 23 Srovnání Ramanových spekter systémů L-cysteinu o dvou finálních koncentracích s koloidem AgBhIV 2019. Excitace 532 nm. SERS signál nedetekován.

Další systém byl připraven s citrátovým koloidem. Elektrosterická stabilizace citrátových koloidů je mnohem větší než u borohydridových koloidů, a tak může být ve srovnání s borohydridovými koloidy méně reaktivní. Extinkční spektrum (viz Obr. 24), nenaznačuje změnu agregačního stavu částic vhodnou k zachycení SERS signálu. Připraveny byly také systémy o koncentraci 0.5 mM, u nichž také nedocházelo k agregaci.



Obr. 24 Extinkční spektrum L-cysteinu ve dvou finálních koncentracích v interakci s citrátovým koloidem AgCit. A – měřeno ihned po přidavku L-cysteinu, B – měřeno po 24 h.

Posledním systémem pro studium interakce stříbrných částic s L-cysteinem byl hydroxylaminový koloid. Povrch částic koloidu by měl být obklopen skupinami OH. Extinkční spektrum (viz Obr. 25), naznačuje, že po 24 h docházelo k mírné agregaci. U systému byl měřen Ramanův rozptyl s excitací 532 nm, avšak ani u tohoto koloidu nebyl detekován SERS signál. Připraveny byly také systémy o koncentraci 0.5 mM, u nichž měla agregace obdobný trend.



Obr. 25 Extinkční spektrum L-cysteinu ve dvou finálních koncentracích v interakci s hydroxylaminovým koloidem AgHAC. A – měřeno ihned po přidavku L-cysteinu, B – měřeno po 24 h.

Při sledování interakce L-cysteinu se stříbrnými koloidy nedošlo k agregaci do takové míry, aby bylo možné detekovat SERS spektrum. Do budoucna by bylo vhodné pozměnit pH roztoku, a tím zvýhodnit interakci cysteinu s příslušnými nanočásticemi.

Pro doplnění informací o interakci L-cysteinu s koloidy byla u vybraných systémů měřena distribuce velikostí částic metodou DLS (Tab. 2), a měřením zeta potenciálu (Tab. 3). Měření byla prováděna u čerstvě připravovaných roztoků, resp. v den jejich přípravy.

Tab. 2: Distribuce velikostí u vybraných systémů s L-cysteinem. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]						
		pouze koloid		finální koncentrace přidaného L-Cy				
				0.1 mM		0.5 mM		1 mM
AgBhIV	intenzita	pk ₁	93 ± 55	(74%)	70 ± 27	(75%)	836 ± 85	(100%)
		pk ₂	6 ± 3	(26%)	4 ± 2	(24%)		
	počet	pk ₁	3 ± 1	(100%)	3 ± 1	(100%)	798 ± 122	(100%)
AgBhIV 19	intenzita	pk ₁	32 ± 14	(65%)		567 ± 76	(90%)	
		pk ₂	530 ± 270	(21%)		61 ± 7	(10%)	
		pk ₃	2 ± 0.3	(14%)				
počet	pk ₁	1 ± 0.2	(100%)		57 ± 8	(99%)		
	pk ₂				555 ± 96	(1%)		
AgCitr	intenzita	pk ₁	93 ± 48	(100%)		91 ± 55	(100%)	
	počet	pk ₁	10 ± 3	(100%)		14 ± 5	(100%)	
AgHAC	intenzita	pk ₁	83 ± 40	(100%)		85 ± 41	(97%)	
		pk ₂				4602 ± 917	(3%)	
	počet	pk ₁	36 ± 11	(100%)		39 ± 12	(100%)	

V případě interakce AgBhIV s 0.1mM systémem je patrné, že naměřené distribuce velikostí dle intenzity zůstávají ve srovnání se samotným koloidem v rámci experimentální chyby stejné. Stejně tak procentuální obsah jednotlivých velikostí je v obdobném poměru, a taktéž početní distribuce zůstává beze změn po přidavku 0.1mM L-cysteinu. Toto koreluje s UV-Vis spektry, kde není ani po 24 h pozorována výrazná agregace systému. V případě přidavku 1mM L-cysteinu došlo dle intenzitní a početní distribuce k nárůstu hodnot odpovídajícímu agregaci částic s L-cysteinem, což je též patrné dle UV-Vis spekter, avšak po 24 h.

U interakce 0.5mM L-cysteinu s novým borohydridovým koloidem DLS hodnoty naznačují relativní nárůst velikostí částic, který odpovídal mírnému agregáčnickému trendu, opět zachycenému v UV-Vis spektrech po 24 h.

Systém složený z citrátového koloidu a 0.5mM L-cysteinu vykazuje dle intenzitních početních distribucí vcelku konstantní hodnoty, a to s ohledem na procentuální zastoupení a experimentální chybu, tzn. že nebyly pozorovány známky agregace, což je plně v souladu s UV-Vis spektrálním měřením.

Výsledky měření distribuce velikostí částic pro 0.5mM L-cystein s AgHAC ukázaly dle intenzitní distribuce mírně zvýšenou polydisperzitu systému, což může naznačovat mírný agregáčnický trend pozorovaný v UV-Vis spektrech po 24 h.

Tab. 3: Výsledky měření zeta potenciálu u vybraných systémů s L-cysteinem. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

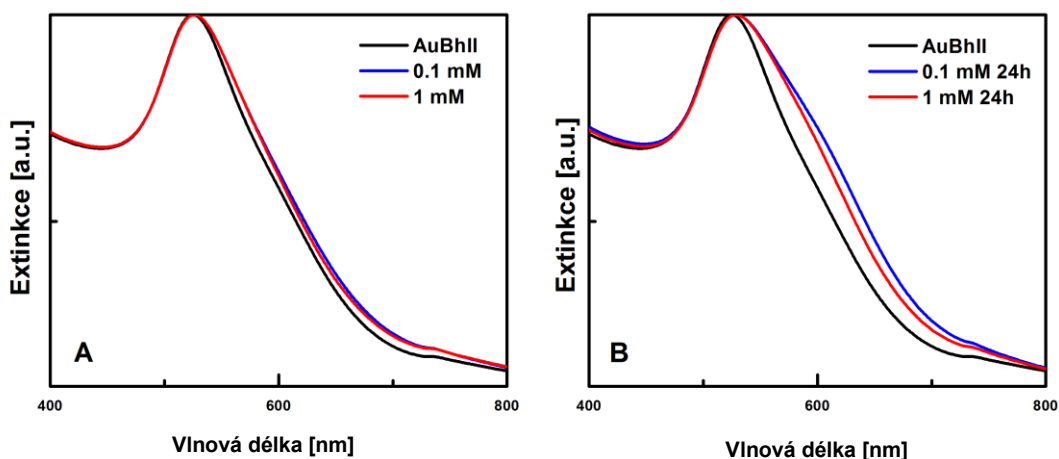
		zeta potenciál [mV]					
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného L-Cy				
			0.1 mM	0.5 mM	1 mM		
AgBhIV	pk₁	-24 ± 10 (56%)	-28 ± 17 (84%)			-24 ± 6 (100%)	
	pk₂	-47 ± 7 (28%)	17 ± 6 (4%)		–		
	pk₃	-73 ± 6 (5%)	-73 ± 4 (4%)				
AgBhIV 19	pk₁	-30 ± 13 (65%)		-37 ± 11 (100%)			
	pk₂	120 ± 2 (8%)	–			–	
	pk₃	-71 ± 10 (7%)					
AgCitr	pk₁	-23 ± 14 (75%)		-23 ± 13 (80%)			
	pk₂	19 ± 5 (4%)	–	-55 ± 6 (8%)		–	
	pk₃	-65 ± 5 (4%)		-81 ± 7 (4%)			
AgHAC	pk₁	-21 ± 15 (94%)		-34 ± 9 (100%)			
	pk₂	-75 ± 7 (3%)	–			–	
	pk₃	23 ± 4 (2%)					

U hodnot zeta potenciálů lze pozorovat v případech AgBh koloidů (přestárlého i nového), že přidavkem L-cysteinu dojde k procentuálnímu nárůstu frakce hodnot zeta potenciálů okolo střední hodnoty -24 mV. To poukazuje na relativní stabilitu výsledného systému, což je v souladu s UV-Vis spektry. Také u 0.5mM systémů s AgCitr a AgHAC pozorujeme dle očekávání absolutní hodnoty svědčící o relativně stabilních systémech.

4.3.1.2 Interakce L-cysteinu se zlatými koloidy

Interakce L-cysteinu byla sledována se třemi různými koloidy zlata.

Starší borohydridový zlatý koloid připravený v roce 2017 interagoval s částicemi po 24 h (viz Obr. 26), a to tím způsobem, že vyšší stupeň agregace byl pozorován u nižšího přidavku L-cysteinu. Tento jev byl potvrzen také prostřednictvím měření distribuce velikostí, jak bude prokázáno a diskutováno dále (Tab. 4).

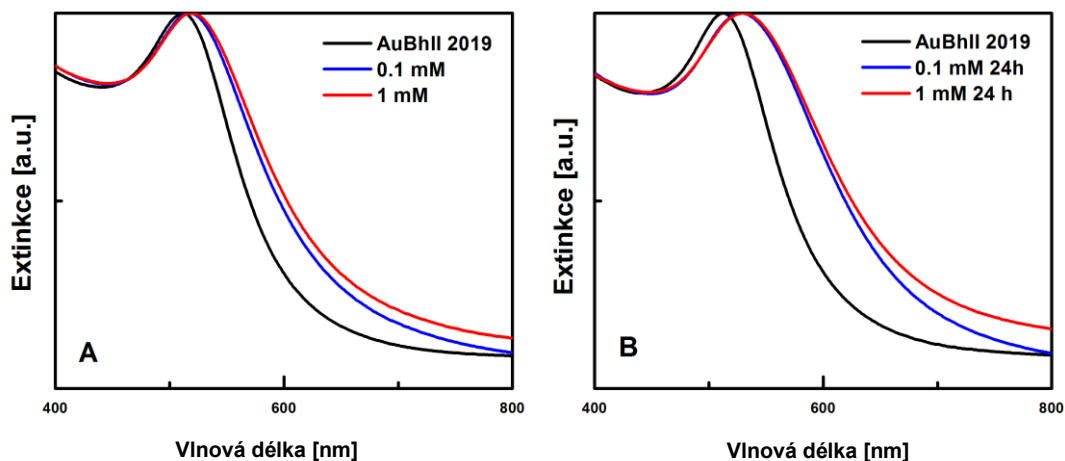


Obr. 26 Extinkční spektrum L-cysteinu ve dvou finálních koncentracích v interakci se starším borohydridovým koloidem AuBhII. A – měřeno ihned po přidavku L-cysteinu, B – měřeno po 24 h.

Systém byl měřen Ramanovým spektrometrem s excitací 785 nm, zesílení však nebylo pozorováno, což bylo očekávatelné s ohledem na nevýznamnou agregaci v této oblasti.

Dále byla měřena interakce L-cysteinu s čerstvě připravenými borohydridovými nanočásticemi, u nichž je také riziko agregační nestability systému v důsledku zrání. Přítomnost volných zlatitých iontů totiž může agregaci ovlivňovat. Z extinkčního spektra (viz Obr. 27) plyne, že systém agreguje ihned

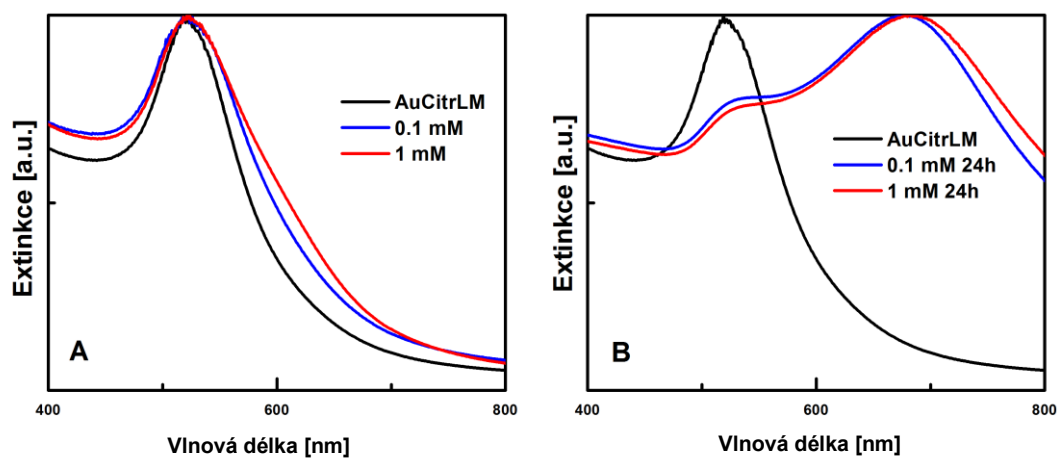
po přidání L-cysteinu ke koloidu. Po 24 h lze ve spektru vidět v důsledku agregace částic posun agregačního maxima. Připraven byl také systém o koncentraci 0.5 mM, který agregoval ve stejném trendu.



Obr. 27 Extinkční spektrum L-cysteinu ve dvou finálních koncentracích v interakci s čerstvým borohydridovým koloidem AuBhII 2019. A – měřeno ihned po přidavku L-cysteinu, B – měřeno po 24 h.

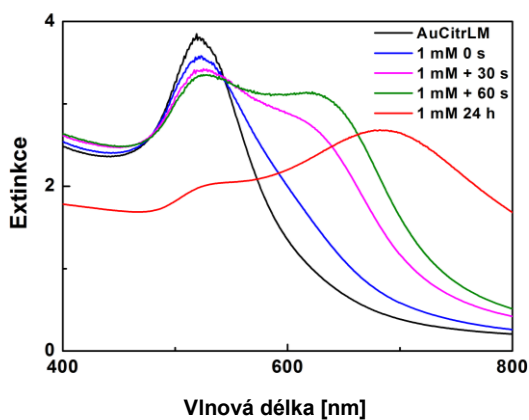
Systémy byly měřeny pomocí Ramanova rozptylu při excitaci 785 nm i 532 nm, avšak zesílení SERS kupodivu nebylo zachyceno, ač by pro zelený laser dle UV-Vis mohlo být pozorováno.

Měření bylo dále provedeno s citrátovým zlatým koloidem. Z extinkčního spektra (viz Obr. 28), je zřejmé, že docházelo k výrazné agregaci u obou koncentrací ihned po přidání L-cysteinu. Ve spektru po 24 h lze vidět druhý pás agregačního maxima v oblasti okolo 680 nm. Měření bylo provedeno také pro koncentraci 0.5 mM, u níž se projevil obdobný trend agregace.



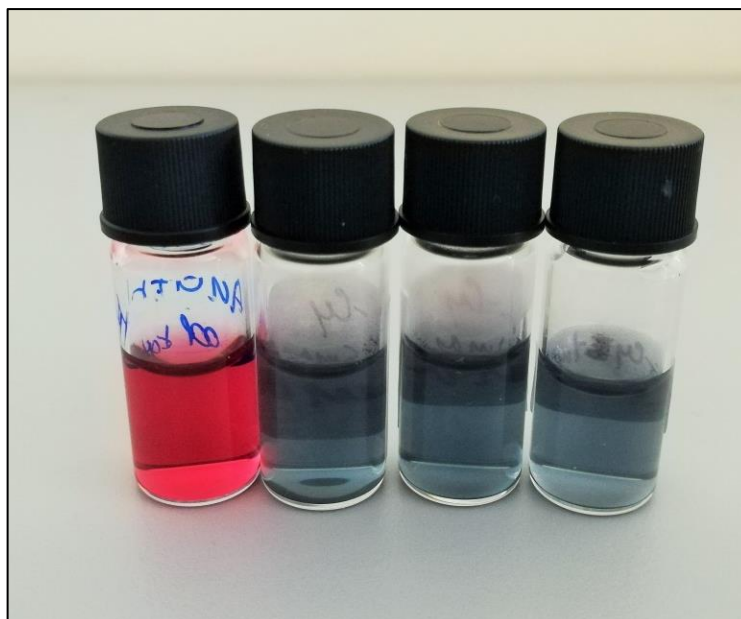
Obr. 28 Extinkční spektrum L-cysteinu ve dvou finálních koncentracích v interakci s citrátovým koloidem AuCitrLM. A – měřeno ihned po přidavku L-cysteinu, B – měřeno po 24 h.

U 1mM AuCitrLM systému, byl sledován také posun agregačního maxima v průběhu první minuty a poté po 24 h, viz Obr. 29.



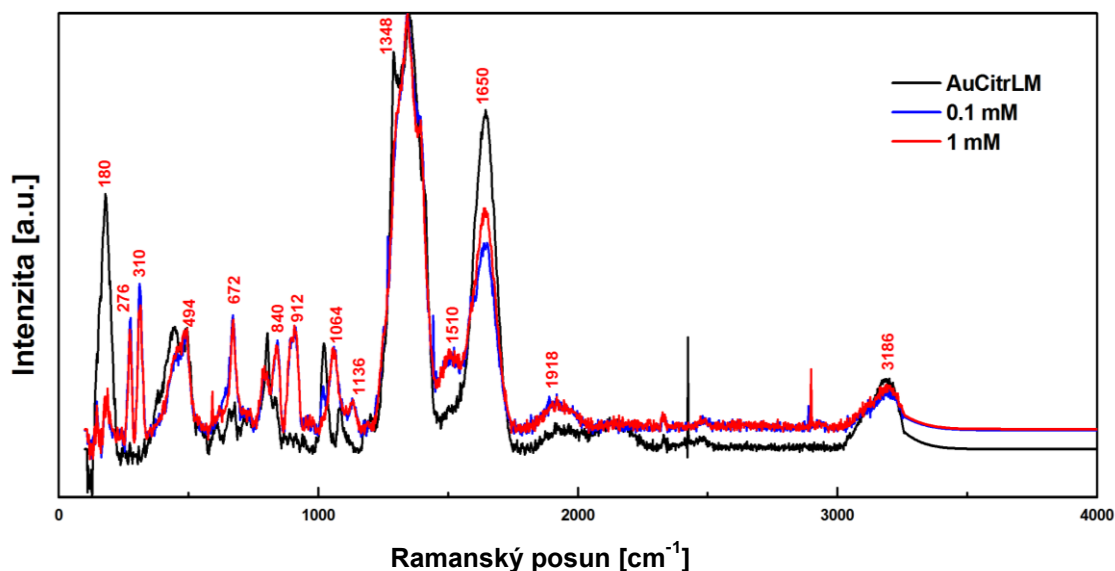
Obr. 29 Extinkční spektrum kinetiky L-cysteinu v 1mM koncentraci v interakci s citrátovým koloidem AuCitrLM.

Z důvodu extinkce koloidů ve viditelné oblasti se agregace s posunem plasmonu projevuje také změnou zabarvení koloidu, viz Obr. 30.



Obr. 30 Koloidní roztok AuCitrLM v interakci s L-cysteinem ve třech různých koncentracích (vlevo pouze koloid).

Systemy byly dále měřeny Ramanovým spektroskopem s excitací 785 nm, (Obr. 31), při kterém byl detekován signál SERS cysteinu ve všech koncentracích. Signál koncentrace 0.5mM systému je zobrazen v Příloze B.



Obr. 31 Srovnání Ramanových spekter systémů L-cysteinu o dvou finálních koncentracích s koloidem AuCitriLM. Signál SERS detekován u obou koncentrací. Excitace 785 nm.

V důsledku absence pásu pro skupiny **SH**, v oblasti **2550–2650 cm⁻¹**, lze předpokládat interakci přes síru, tedy vazbu **Au-S**, která by mohla být v Ramanově spektru situována okolo **276 a 310 cm⁻¹**.

K doplnění informací o interakci L-cysteinu s koloidy byla u vybraných systémů měřena distribuce velikostí částic (Tab. 4) a zeta potenciál (Tab. 5).

Tab. 4 Distribuce velikostí u vybraných systémů pro L-cystein. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]								
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného L-Cy							
			0.1 mM		0.5 mM		1 mM			
AuBhlI	pk₁	42 ± 22	(82%)	39 ± 13	(49%)			45 ± 23	(74%)	
	intenzita	pk₂	2 ± 1	(7%)	440 ± 256	(42%)			322 ± 185	(26%)
		pk₃	3 ± 1	(1%)	4289 ± 1046	(8%)				
	počet	pk₁	1 ± 0.4	(100%)	24 ± 6	(100%)			16 ± 5	(100%)
AuBhlI 19	intenzita	pk₁	194 ± 63	(90%)			30 ± 12	(52%)		
		pk₂	9 ± 2	(10%)			416 ± 189	(48%)		
	počet	pk₁	7 ± 2	(100%)			16 ± 4	(100%)		
AuCitrLM	intenzita	pk₁	81 ± 31	(60%)	786 ± 185	(62%)	910 ± 239	(79%)	417 ± 96	(63%)
		pk₂	295 ± 100	(23%)	166 ± 23	(21%)	176 ± 42	(21%)	1391 ± 270	(21%)
		pk₃	20 ± 5	(17%)	4736 ± 744	(17%)			84 ± 11	(16%)
	počet	pk₁	10 ± 2	(100%)	202 ± 30	(93%)	134 ± 19	(96%)	97 ± 19	(96%)
		pk₂			700 ± 180	(7%)	714 ± 113	(4%)	423 ± 117	(4%)

Z výsledků měření DLS plyne, že v případě AuBhlI, je u 0.1mM ve srovnání s 1mM systémem vyšší nárůst intenzitních i početních hodnot velikostí částic. To potvrzuje vyšší stupeň agregace u 0.1mM systému pozorovaný v UV-Vis spektru po 24 h.

V případě nového borohydridového koloidu byla u 0.5mM systému dle intenzity zachována bimodální distribuce částic a byl pozorován relativní nárůst zastoupení větších částic, odpovídající agregaci čerstvého borohydridového koloidu. Početní distribuce taktéž prokázala relativní nárůst velikostí částic.

Z naměřených hodnot pro AuCitrLM koloid v interakci s L-cysteinem vyplývá, že došlo u všech přidaných koncentrací k vysokému nárůstu hodnot velikostí částic ve srovnání se samotným koloidem. Dle intenzitní distribuce lze pozorovat nárůst hodnot, přičemž zastoupení frakcí je ve srovnání se samotným koloidem zachováno. Početní distribuce naznačuje ve všech koncentracích opakující se změnu z monomodální distribuce na bimodální. Výsledky potvrzují výraznou agregaci pozorovanou též v UV-Vis spektrech.

Tab. 5 Hodnoty zeta potenciálů u vybraných systémů s L-cysteinem. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		zeta potenciál [mV]					
		pouze koloid		finální koncentrace přidaného L-Cy			
				0.1 mM	0.5 mM	1 mM	
AuBhlI	pk₁	-24 ± 8	(100%)	-23 ± 9	(74%)	-25 ± 8	(98%)
	pk₂			6 ± 2	(23%)	–	3 ± 2 (2%)
	pk₃			-48 ± 4	(3%)		
AuBhlI 19	pk₁	-29 ± 9	(95%)		-39 ± 10	(55%)	
	pk₂	-58 ± 3	(2%)	–	-18 ± 10	(42%)	–
	pk₃	121 ± 2	(2%)		-12 ± 5	(2%)	
AuCitrLM	pk₁	-26 ± 9	(94%)	-31 ± 5	(100%)	-30 ± 5	(100%) -31 ± 6 (100%)
	pk₂	-50 ± 4	(6%)				

Z hodnot měření zeta potenciálu lze u 0.1mM systému sledovat, že frakce blízká hodnotě -24 mV je procentuálně nižší než stejná frakce pro 1mM systém. To odpovídá v UV-Vis spektru projevenému trendu vyššího stupně agregace pro 0.1mM systém.

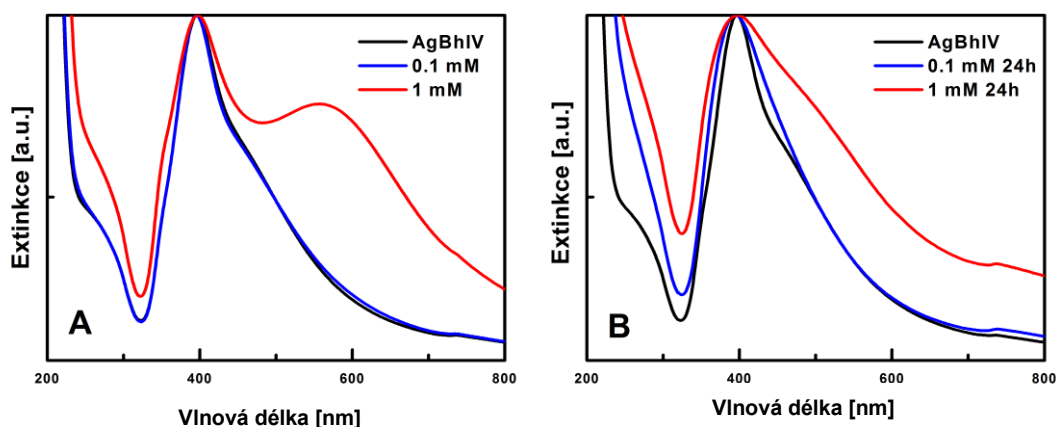
V případě hodnot zeta potenciálu u čerstvého borohydridového koloidu lze ve srovnání se samotným koloidem pozorovat snížení stability, což odpovídá trendu pozorované agregace v UV-Vis spektru.

Měření zeta potenciálu u výrazně agregujících AuCitrLM systémů naznačuje, že přestože se jedná o vysoce agregující systém, zeta potenciál nevykazuje významné změny. Důvodem může být vysoká elektrosterická stabilizace citrátových koloidů v interakci s L-cysteinem, poněvadž molekuly L-cysteinu prokazatelně interagují s povrchem nanočástic, jak bylo prokázáno SERS spektry, a mohou tak pomoci vytvořit stabilnější elektrickou dvojvrstvu.

4.3.2 Interakce NACyM sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu

4.3.2.1 Interakce NACyM se stříbrnými koloidy

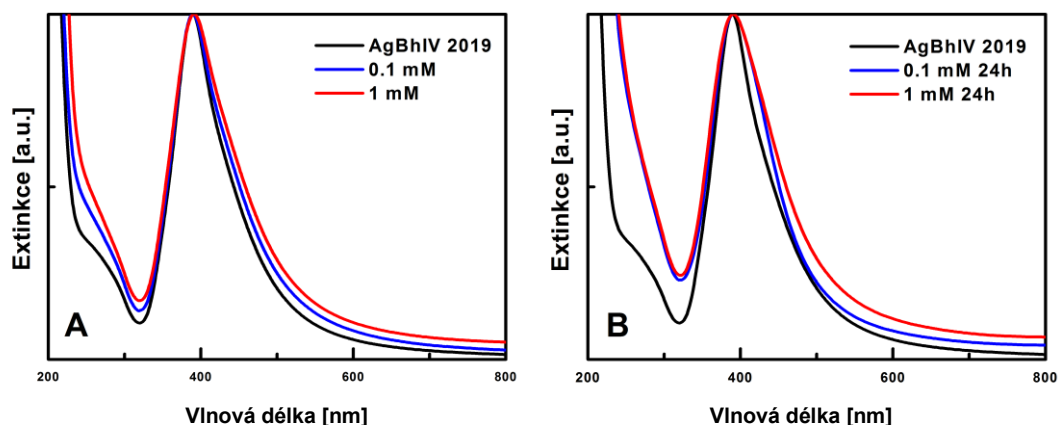
Interakce NACyM byla sledována se dvěma různými stříbrnými koloidy. Dle extinkčních spekter staršího borohydridového koloidu (Obr. 32) vzniklo ihned po přidání 1 mM koncentrace NACyM druhé agregační maximum v oblasti 570 nm. Druhý pás naznačuje agregaci částic, protože přidavkem NACyM došlo k porušení jejich elektrostatické dvojvrstvy. Lze tudíž říci, že NACyM interaguje s těmito nanočásticemi. Vzniklé agregační maximum další agregací v čase klesá a po 24 h již není patrné.



Obr. 32 Extinkční spektrum NACyM ve dvou finálních koncentracích v interakci se starším borohydridovým koloidem AgBhIV.

A – měřeno ihned po přidavku NACyM, B – měřeno po 24 h.

Dále byla sledována interakce NACyM s čerstvými borohydridovými koloidy, u nichž dle extinkčních spekter (Obr. 33) nedocházelo k agregačnímu posunu vhodnému k měření SERS. Systémy obou koloidů byly měřeny Ramanovým spektrometrem s excitací 785 nm, ale zesílení nebylo detekováno.



Obr. 33 Extinkční spektrum NACyM ve dvou finálních koncentracích v interakci s čerstvým borohydridovým koloidem AgBhIV 2019. A – měřeno ihned po přidavku NACyM, B – měřeno po 24 h.

K doplnění informací o interakci NACyM s koloidy byla u vybraných systémů měřena distribuce velikostí částic (Tab. 6) a zeta potenciál (Tab. 7).

Tab. 6 Distribuce velikostí u vybraných systémů pro NACyM. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]						
		pouze koloid		finální koncentrace přidaného NACyM				
				0.1 mM		1 mM		
AgBhIV	pk₁	93 ± 55	(74%)	63 ± 32	(72%)	510 ± 70	(72%)	
	intenzita	pk₂	6 ± 3	(26%)	4 ± 2	(24%)	72 ± 13	(28%)
		pk₃			4283 ± 973	(2%)		
počet	pk₁	3 ± 1	(100%)	2 ± 1	(100%)	62 ± 12	(99%)	
	pk₂					503 ± 87	(1%)	

Z naměřených DLS hodnot vyplývá, že na rozdíl od 0.1mM koncentrace systému je v případě přidavku 1mM koncentrace NACyM významný relativní nárůst velikosti částic, a to jak dle intenzitní, tak dle početní distribuce. To je plně v souladu s pozorovaným UV-Vis spektrem, kdy v případě 1mM systému docházelo k výrazné agregaci.

Tab. 7 Hodnoty zeta potenciálů u vybraných systémů pro NACyM. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		zeta potenciál [mV]					
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného NACyM				
			0.1 mM	1 mM			
AgBhIV	pk ₁	-24 ± 10	(56%)	-33 ± 11	(42%)	-27 ± 7	(68%)
	pk ₂	-47 ± 7	(28%)	-9 ± 8	(36%)	7 ± 7	(33%)
	pk ₃	-73 ± 6	(5%)	18 ± 7	(10%)		

Hodnoty zeta potenciálu naznačují nestabilitu systému v případě 1mM NACyM v interakci s borohydridovým koloidem. Pozorujeme totiž 33% frakci distribuce zeta potenciálu s absolutní hodnotou menší než 10, odpovídající vysoké nestabilitě systému.

4.3.2.2 Interakce NACyM se zlatými koloidy

Interakce NACyM byla sledována u staršího i čerstvého borohydridového koloidu. V extinkčních spektrech však nebyla pozorována agregační změna vhodná k měření SERS (spektra tudíž nejsou ukázána). Výsledky měření distribuce velikostí a zeta potenciálu systémů jsou uvedeny v Tab. 8 a Tab. 9.

Tab. 8 Distribuce velikostí u vybraných systémů pro NACyM. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]						
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného NACyM					
			0.1 mM	1 mM				
AuBhII	pk ₁	42 ± 22	(82%)	35 ± 15	(89%)	40 ± 16	(75%)	
	intenzita	pk ₂	2 ± 1	(7%)	1 ± 0	(6%)	3 ± 2	(14%)
		pk ₃	3 ± 1	(1%)	3 ± 1	(4%)	2 ± 1	(11%)
	počet	pk ₁	1 ± 0	(100%)	1 ± 0	(100%)	2 ± 1	(100%)

Podobnost hodnot a rozložení distribucí velikostí částic obou koncentrací NACyM s AuBhII ve srovnání s koloidem samotným naznačují, že nedošlo ke změnám agregačních stavů, což odpovídá naměřeným UV-Vis spektrům, ve kterých nebyla pozorována agregace.

Tab. 9 Hodnoty zeta potenciálů u vybraných systémů pro NACyM. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		zeta potenciál [mV]					
		pouze koloid		finální koncentrace přidaného NACyM			
				0.1 mM		1 mM	
AuBhII	pk₁	-24 ± 8	(100%)	-16 ± 11	(49%)	37 ± 2	(56%)
	pk₂			-47 ± 11	(16%)	-78 ± 5	(14%)
	pk₃			17 ± 7	(15%)	-63 ± 5	(13%)

Absolutní hodnoty naměřených zetapotenciálů u obou koncentrací NACyM v interakci s AuBhII nevykazují agregační nestabilitu systémů. Procentuální rozložení hodnot zeta potenciálů se však výrazně liší od samotného koloidu. Pozoruhodný je nárůst frakcí s vysoce zápornými (okolo -70 mV) a vysoce kladnými hodnotami (okolo +37 mV) zeta potenciálu pro systém s 1mM NACyM. Tento jev by měl být dále prozkoumán, i když v principu koreluje s výsledky UV-Vis a DLS měření, která potvrzují stabilní, neagregující systém.

4.3.3 Interakce taurinu sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu

4.3.3.1 Interakce taurinu se stříbrnými koloidy

Také interakce taurinu byla sledovaná u obou borohydridových koloidů. Ani zde v extinkčních spektrech však nebyla pozorována agregační změna vhodná k měření SERS. Výsledky měření distribuce velikostí a zeta potenciálu systémů potvrzující tuto skutečnost jsou uvedeny v Tab. 10 a Tab. 11.

Tab. 10 Distribuce velikostí u vybraných systémů pro taurin. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]						
		pouze koloid		finální koncentrace přidaného taurinu				
				0.1 mM		1 mM		
AgBhIV	intenzita	pk ₁	93 ± 55	(74%)	50 ± 26	(70%)	52 ± 27	(70%)
		pk ₂	6 ± 3	(26%)	5 ± 2	(30%)	5 ± 2	(30%)
	počet	pk ₁	3 ± 1	(100%)	3 ± 1	(100%)	3 ± 1	(100%)

Bimodální distribuce velikostí dle intenzity pro samotný koloid AgBhIV s převahou větších částic je zachována i po přidavku taurinu ve dvou zvolených koncentracích. Podobnost hodnot distribucí velikostí (v rámci experimentálních chyb) obou přidaných koncentrací taurinu s hodnotami samotného koloidu odpovídá tomu, že nebyla pozorována agregace v UV-Vis spektrech.

Tab. 11 Hodnoty zeta potenciálů u vybraných systémů pro taurin. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		zeta potenciál [mV]					
		pouze koloid		finální koncentrace přidaného taurinu			
				0.1 mM		1 mM	
AgBhIV	pk ₁	-24 ± 10	(56%)	-26 ± 9	(50%)	-34 ± 11	(57%)
	pk ₂	-47 ± 7	(28%)	-8 ± 3	(15%)	-12 ± 4	(18%)
	pk ₃	-73 ± 6	(5%)	8 ± 9	(14%)	7 ± 9	(14%)

Z Tab. 11 je rovněž patrné, že přidavek taurinu k AgBhIV významně neovlivní procentuální obsah frakce okolo střední hodnoty -24 mV, což poukazuje na stabilitu systému a koreluje jak s DLS výsledky, tak s UV-Vis spektry, v nichž nebyla pozorována agregace.

4.3.3.2 Interakce taurinu se zlatými koloidy

S oběma borohydridovými zlatými koloidy byla sledována interakce taurinu. Dle extinkčních spekter však nedocházelo k žádné agregaci, a měření SERS tudíž postrádalo smysl. Výsledky měření distribuce velikostí částic a zeta potenciálu jsou uvedeny v Tab. 12 a Tab. 13.

Tab. 12 Distribuce velikostí u vybraných systémů s taurinem. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]					
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného taurinu				
			0.1 mM		1 mM		
AuBhII	pk₁	42 ± 22	(82%)	51 ± 26	(81%)	40 ± 20	(85%)
	intenzita						
	pk₂	2 ± 1	(7%)	2 ± 1	(9%)	2 ± 1	(9%)
	pk₃	3 ± 1	(1%)	1 ± 0	(8%)	1 ± 0	(6%)
	počet						
	pk₁	1 ± 0.4	(100%)	1 ± 0.2	(100%)	1 ± 0.3	(100%)

Podobnost hodnot distribucí velikostí obou přidaných koncentrací taurinu k AuBhII opět odpovídá tomu, že jde o stabilní systém bez známek agregace, tudíž výsledek získaný z UV-Vis spekter.

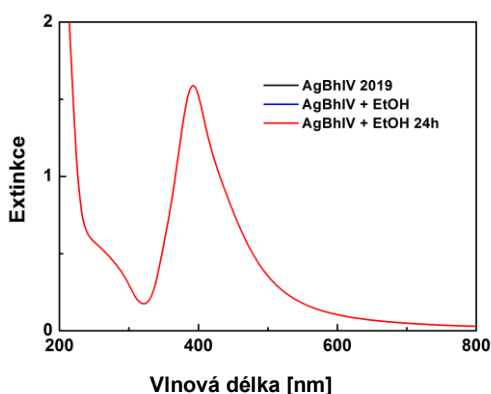
Tab. 13 Hodnoty zeta potenciálů u vybraných systémů s taurinem. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		zeta potenciál [mV]					
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného taurinu				
			0.1 mM		1 mM		
AuBhII	pk₁	-24 ± 8	(100%)	-7 ± 6	(72%)	-25 ± 8	(75%)
	pk₂			88 ± 2	(27%)	5 ± 4	(12%)
	pk₃			22 ± 2	(2 %)	21 ± 4	(12%)

Naměřené hodnoty zeta potenciálů v systémech s taurinem jsou relativně rozporuplné s ohledem na jejich neagregační chování pozorované jak UV-Vis spektroskopii, tak potvrzené DLS měřením. Zatím není úplně zřejmé, proč se systém takto projevuje, ale může to souviset s molekulou taurinu, která bude v roztoku figurovat jako zwitterion a ovlivňovat elektrickou dvojvrstvu nanočástic vlivem zvýšené iontové síly roztoku.

4.3.4 Interakce NAPCy sledovaná prostřednictvím UV-Vis absorpce, Ramanova rozptylu, DLS a zeta potenciálu

Z důvodu používání ethanolu pro přípravu zásobního roztoku NAPCy bylo nejprve ověřeno, že se ethanol neadsorbuje, neovlivňuje agregaci, a tudíž ho lze využívat i jako případný vnitřní standard. Pro příklad je uvedeno extinkční spektrum ze systému přidavku ethanolu k čerstvým stříbrným borohydridovým nanočásticím, (Obr. 34).

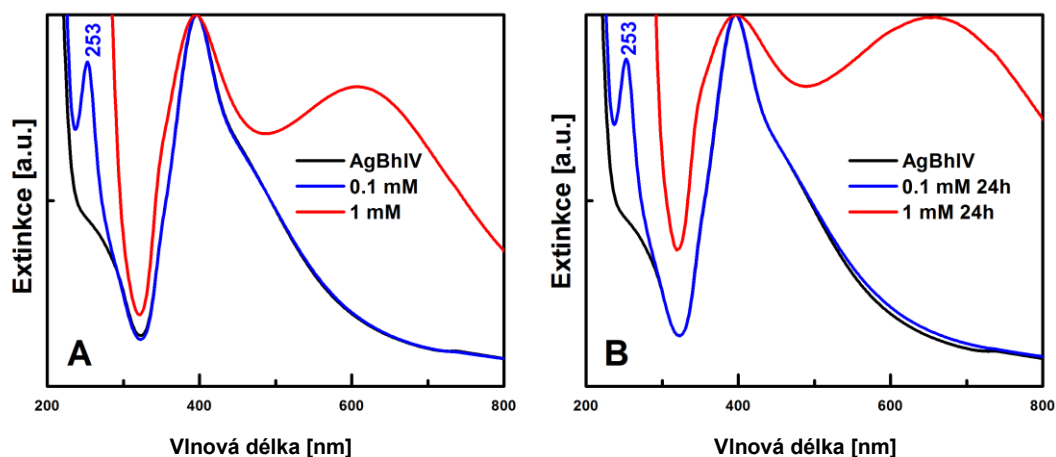


Obr. 34 Extinkční spektrum ethanolu v interakci s borohydridovým koloidem AgBhIV 2019.

4.3.4.1 Interakce NAPCy se stříbrnými koloidy

Interakce NAPCy byla studována s použitím čtyř různých koloidů stříbra.

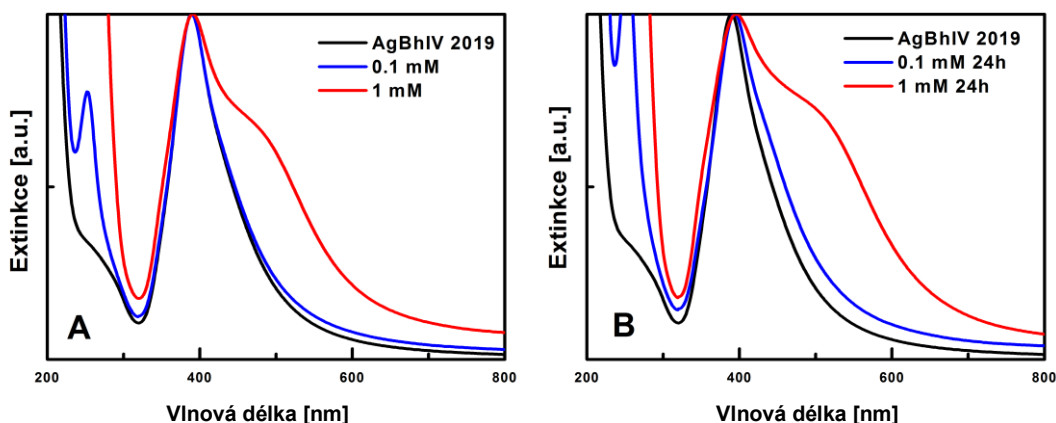
Z extinkce staršího borohydridového koloidu (Obr. 35) je zřejmé, že ihned po přidání látky v 1mM koncentraci dochází k agregaci, což se projeví vznikem druhého agregačního maxima u 610 nm. Po 24 h se druhé agregační maximum posunulo doprava z 610 na 660 nm. Ve všech spektrech s NAPCy byl pozorován pás v oblasti 253 nm. Dle Kelly a Price (2005), absorbují v oblasti vlnových délek 250 až 290 nm postranní řetězce aromatických aminokyselin (Phe, Tyr, Trp), proto byl pás přiřazen fenylu obsaženému v molekule NAPCy. V případě vzorků o koncentraci 1 mM byl pás tak intenzivní, že přesycoval detektor, a proto není ve spektrech zobrazen.



Obr. 35 Extinkční spektrum NAPCy ve dvou finálních koncentracích v interakci se starším borohydridovým koloidem AgBhIV. A – měřeno ihned po přidavku NAPCy, B – měřeno po 24 h.

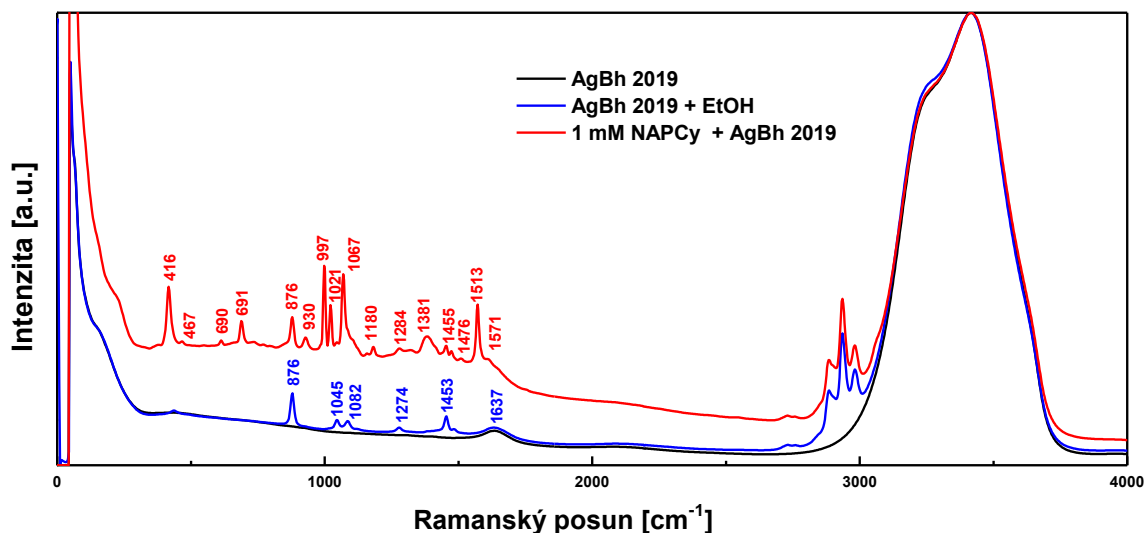
Systémy byly změřeny na Ramanově spektrometru s excitací 785 nm. Přestože excitační vlnová délka laseru částečně spadá do oblasti rezonance se vzniklým agregačním maximem, zesílení SERS nebylo zachyceno. Látka se zřejmě neadsorbovala dostatečně blízko k povrchu nanočástic. Dle hodnot vlnových délek agregačních maxim nově vzniklého pásu je evidentní, že by bylo vhodnější použít laser o excitaci 633 nm, kterým však nebylo disponováno.

Připraven byl také systém s čerstvým borohydridovým koloidem. Ze spektra (Obr. 36) je patrné, že i u nově syntetizovaného borohydridového koloidu dochází k agregaci systému při 1 mM koncentraci NAPCy. Trend agregace se liší, neboť se nevytváří tak výrazné druhé agregační maximum.



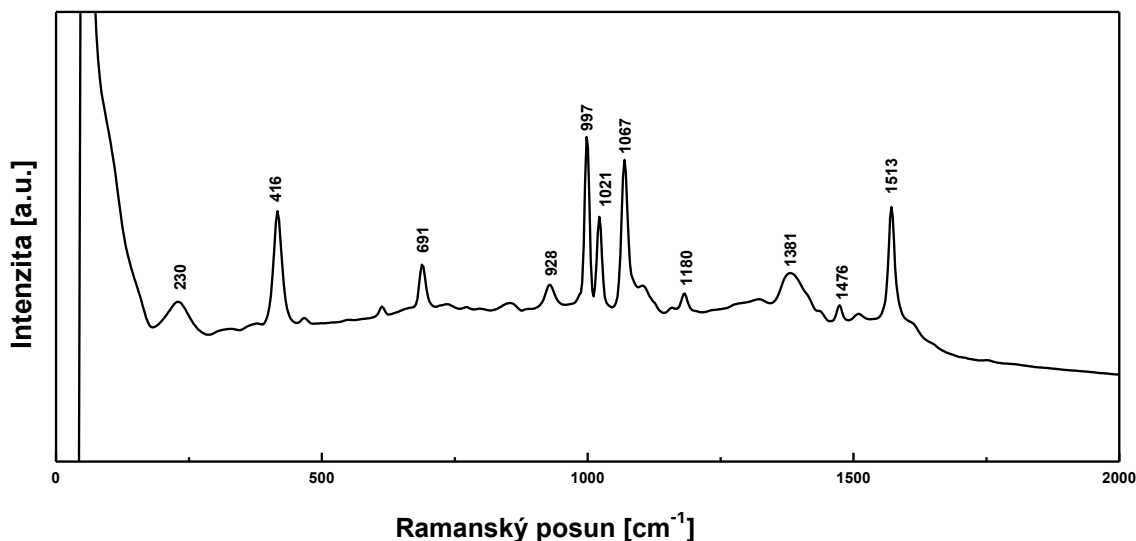
Obr. 36 Extinkční spektrum NAPCy ve dvou finálních koncentracích v interakci s čerstvým koloidem AgBhIV 2019. A – měřeno ihned po přidavku NAPCy, B – měřeno po 24 h.

S ohledem na částečnou agregaci nanočástic v interakci s NAPCy, projevující se vznikem raménka u cca 500 nm v UV-Vis spektru, byla pro měření Ramanova spektra zvolena excitace laseru 532 nm a SERS signál byl získán. V důsledku použití rozpouštědla, ethanol : voda, při přípravě zásobního roztoku NAPCy, bylo změřeno také spektrum samotného koloidu s přídavkem směsi ethanol : voda o množství použitým při přípravě 1mM vzorku (Obr. 37).



Obr. 37 Srovnání Ramanových spekter 1mM systému NAPCy s koloidem AgBhIV 2019 a se systémem s ethanolem měřeným pro odečet. Excitace 532 nm. Výkon laseru na vzorku 8.8 mW.

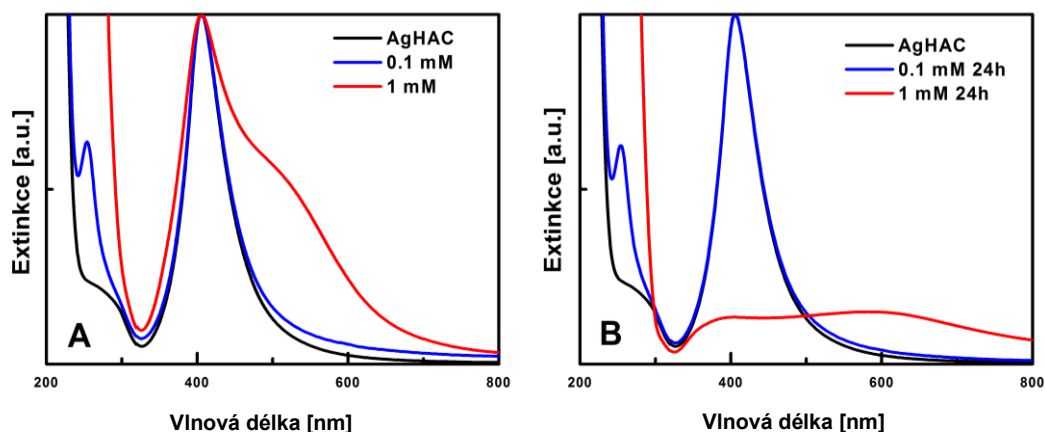
Odečtem spektra koloidu s ethanolem od spektra vzorku bylo vytvořeno diferenční spektrum (viz Obr. 38). V tomto spektru je patrný pás 230 cm^{-1} , který je charakteristický pro vazbu **Ag-OOC**; další charakteristické pásy karboxylátu interagujícího s povrchem stříbrných nanočástic jsou též patrné, jedná se o pásy s maximy u 1381 a 1513 cm^{-1} . Z uvedeného je zřejmé, že NAPCy interaguje s povrchem Ag nanočástic převážně prostřednictvím volné karboxylové skupiny.



Obr. 38 Diferenční spektrum SERS signálu zachyceného při interakci 1mM systému NAPCy s AuCitrLM.

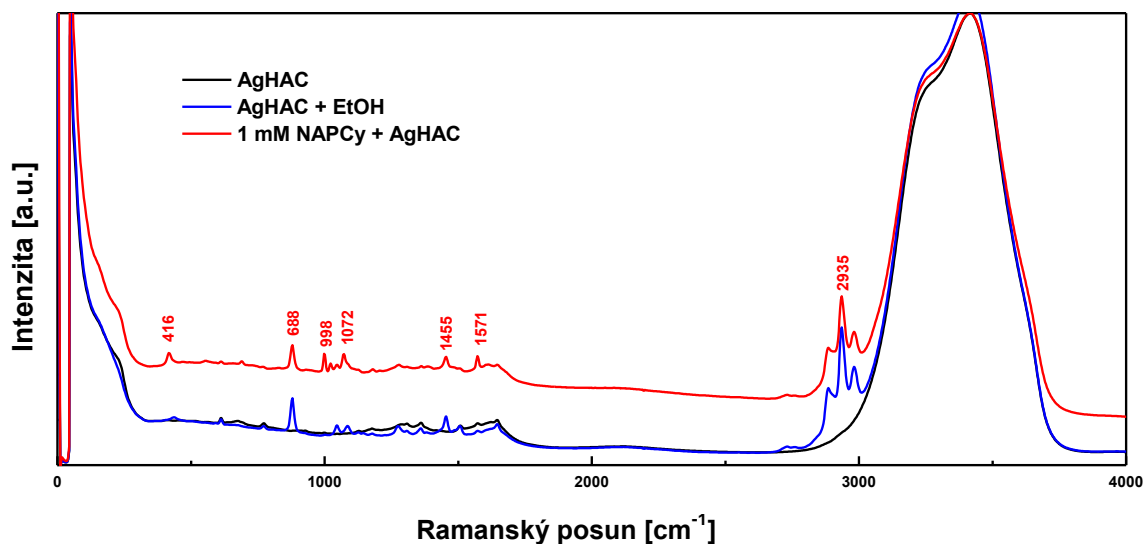
Ze spekter extinkce systémů o koncentraci 0.5 mM připravovaných pro měření Ramanova rozptylu bez rušících pásů ethanolu bylo patrné, že snížením koncentrace NAPCy na polovinu nebyla překročena agregační bariéra. Z toho důvodu při excitaci 532 nm nebylo u 0.5mM systémů SERS spektrum detekováno.

Další interakce NAPCy byla sledována s hydroxylaminovým koloidem. Z extinkčního spektra, (Obr. 39) vyplývá, že 1mM systém agreguje ihned po přidání NAPCy. Po 24 h je systém agregovaný natolik, že došlo k posunu maxima k oblasti 600 nm, což naznačuje, že by systém bylo vhodnější měřit s použitím excitace 633 nm, kterou však disponováno nebylo.



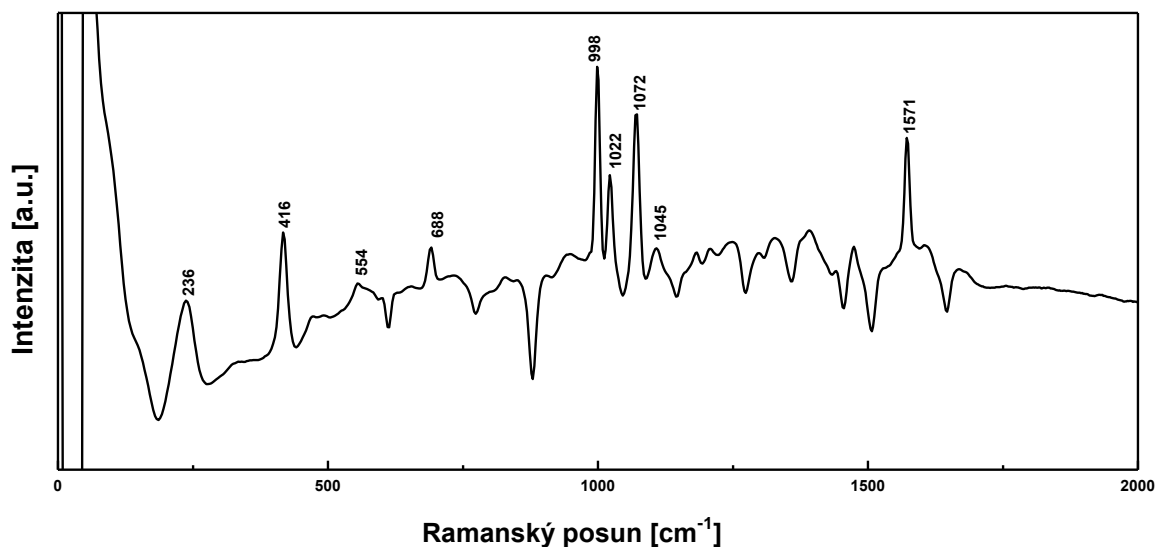
Obr. 39 Extinkční spektrum NAPCy ve dvou finálních koncentracích v interakci s koloidem AgHAC. A – měřeno ihned po přidavku NAPCy, B – měřeno po 24 h.

Pro měření SERS spekter byly vyzkoušeny excitace 532 nm i 785 nm. Při excitaci 785 nm SERS signál nebyl zachycen, byl však detekován při excitaci 532 nm. Také v tomto případě bylo měřeno i spektrum samotného koloidu se směsí ethanol : voda (Obr. 40).



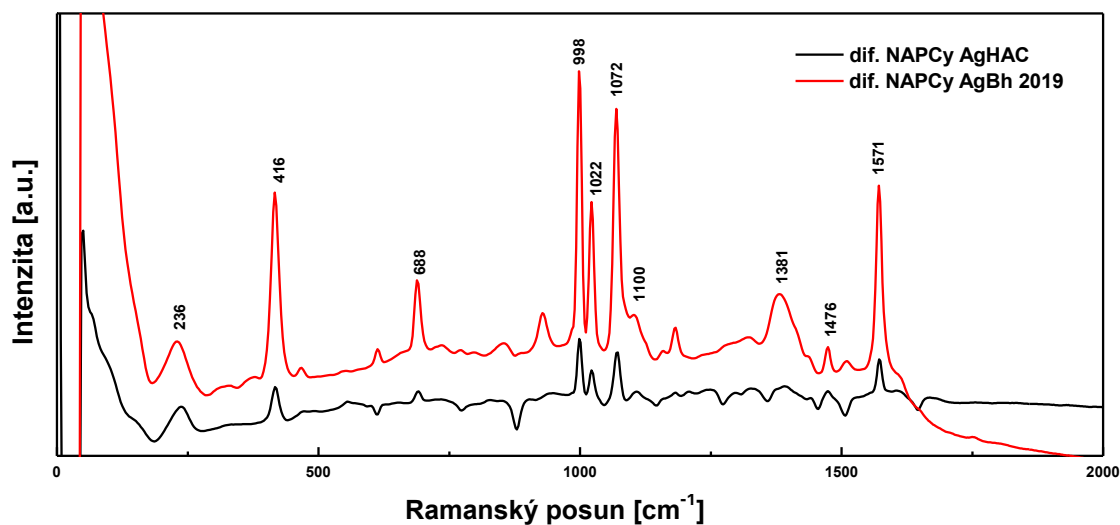
Obr. 40 Srovnání Ramanových spekter 1mM systému NAPCy s koloidem AgHAC a se systémem s ethanolem měřeným pro odečet. Excitace 532 nm. Výkon laseru na vzorku 8.8 mW.

Odečtem spektra koloidu s ethanolem od spektra vzorku bylo vytvořeno diferenční spektrum (viz Obr. 41). Opět jsou patrné pásy charakteristické pro interakci s povrchem Ag nanočástic prostřednictvím karboxylátu.



Obr. 41 Diferenční spektrum SERS signálu zachyceného při interakci 1mM NAPCy s AgHAC.

Srovnáním diferenčních spekter koloidu AgBh a AgHAC lze vidět shody v pásech, které potvrzují, že pozorované pásy pochází od NAPCy navázaného v obou případech prostřednictvím karboxylátové skupiny.



Obr. 42 Srovnání diferenčních spekter SERS signálů NAPCy detekovaných při interakci s koloidy AgHAC a AgBhIV 2019.

Studován byl také systém s citrátovým koloidem, u něhož nebyla patrná významná agregační změna, tudíž spektra nejsou ukazována. Měření bylo provedeno i v koncentraci 0.5 mM (bez ethanolu).

K doplnění informací o interakci NAPCy s koloidy byla u vybraných systémů měřena distribuce velikostí částic (Tab. 14) a zeta potenciál (Tab. 15)

Tab. 14 Distribuce velikostí u vybraných systémů s NAPCy. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]								
		pouze koloid		finální koncentrace přidaného NAPCy						
				0.1 mM		0.5 mM		1 mM		
AgBhIV	intenzita	pk ₁	93 ± 55	(74%)	55 ± 30	(70%)			174 ± 59	(95%)
		pk ₂	6 ± 3	(26%)	5 ± 2	(30%)			4665 ± 800	(5%)
	počet	pk ₁	3 ± 0.8	(100%)	3 ± 1	(100%)			42 ± 20	(100%)
AgBhIV 19	intenzita	pk ₁	32 ± 14	(65%)			48 ± 35	(68%)		
		pk ₂	530 ± 270	(21%)			534 ± 320	(14%)		
		pk ₃	2 ± 0.3	(14%)			1 ± 0.3	(12%)		
počet	pk ₁	1 ± 0.2	(100%)			1 ± 0.1	(100%)			
AgCitr	intenzita	pk ₁	93 ± 48	(100%)			114 ± 79	(100%)		
	počet	pk ₁	10 ± 3	(100%)			11 ± 4	(100%)		
AgHAC	intenzita	pk ₁	83 ± 40	(100%)	69 ± 25	(100%)	94 ± 44	(100%)	1022 ± 210	(100%)
	počet	pk ₁	36 ± 11	(100%)	39 ± 11	(100%)	38 ± 12	(100%)	995 ± 230	(100%)

Hodnoty distribuce velikostí u staršího koloidu AgBhIV vykazují, že při přidavku 0.1mM koncentrace NAPCy zůstávají velikosti dle intenzitní i početní distribuce stejné (v rámci experimentální chyby). V případě 1mM systému lze pozorovat dle distribuce intenzity i počtu vysoký relativní nárůst hodnot velikostí částic, což odpovídá naměřenému UV-Vis spektru, kde byla u 1mM koncentrace pozorována výrazná agregace.

V případě 0.5mM koncentrace přidané k čerstvému koloidu AgBhIV 19, a též k AgCitr nedochází k výrazným změnám distribuce velikostí částic, což odpovídá tomu, že nebyla pozorována agregace v UV-Vis spektrech.

Systém s AgHAC a NAPCy odpovídá dle DLS měření zmiňovanému pozorování pomocí UV-Vis spektroskopie a lze konstatovat, že pouze 1mM koncentrace NAPCy vede k agregaci AgHAC nanočástic.

Tab. 15 Hodnoty zeta potenciálů u vybraných systémů s NAPCy. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

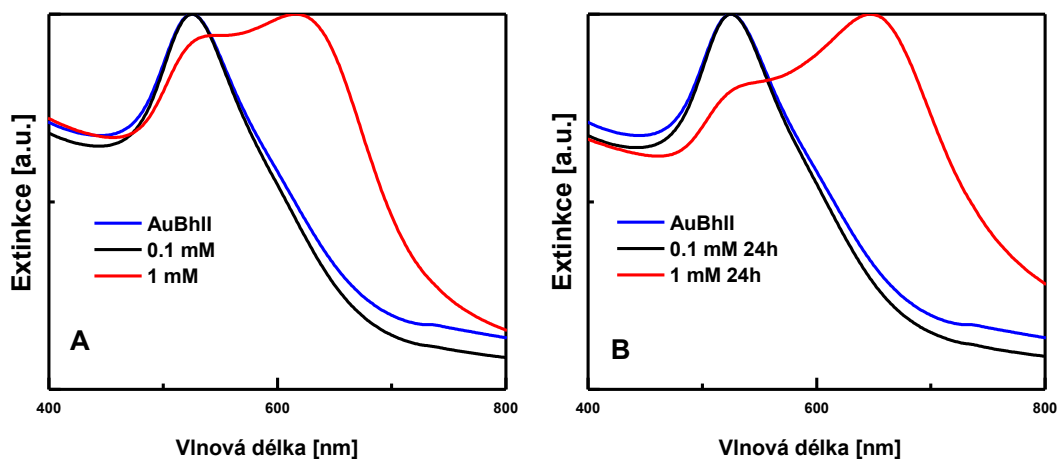
		zeta potenciál [mV]					
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného NAPCy				
			0.1 mM	0.5 mM	1 mM		
AgBhIV	pk₁	-24 ± 10 (56%)	-26 ± 17 (80%)			-32 ± 10 (84%)	
	pk₂	-42 ± 7 (28%)	11 ± 4 (5%)	–		17 ± 4 (16%)	
	pk₃	-73 ± 6 (5%)	-87 ± 8 (5%)				
AgBhIV 19	pk₁	-30 ± 13 (65%)		-24 ± 14 (90%)			
	pk₂	120 ± 2 (8%)	–	18 ± 3.4 (3%)		–	
	pk₃	-71 ± 10 (7%)		-80 ± 6 (3%)			
AgCitr	pk₁	-23 ± 14 (75%)		-25 ± 14 (68%)			
	pk₂	18 ± 5 (4%)	–	-122 ± 4 (7%)		–	
	pk₃	-65 ± 5 (4%)		-62 ± 5 (5%)			
AgHAC	pk₁	-21 ± 15 (94%)	-20 ± 13 (96%)	-28 ± 13 (100%)		-15 ± 4 (100%)	
	pk₂	-75 ± 7 (3%)	-62 ± 4 (2%)				
	pk₃	23 ± 4 (2%)	-143 ± 4 (1%)				

Z hodnot zeta potenciálů pro NAPCy s AgBhIV koloidy lze usuzovat na změny ve stabilitě systémů, zvláště v případě 1mM koncentrace NAPCy, kdy významně narůstá frakce s hodnotami zeta potenciálu okolo +17 mV. Tento výsledek koreluje s pozorováním UV-Vis spektroskopí a též DLS výsledky.

Výsledné hodnoty zeta potenciálu pro systém s NAPCy a AgHAC opět odpovídají pozorováním UV-Vis spektroskopí a naměřeným DLS výsledkům pro tento systém, neboť je evidentní pokles stability (hodnoty okolo -15 mV).

4.3.4.2 Interakce NAPCy se zlatými koloidy

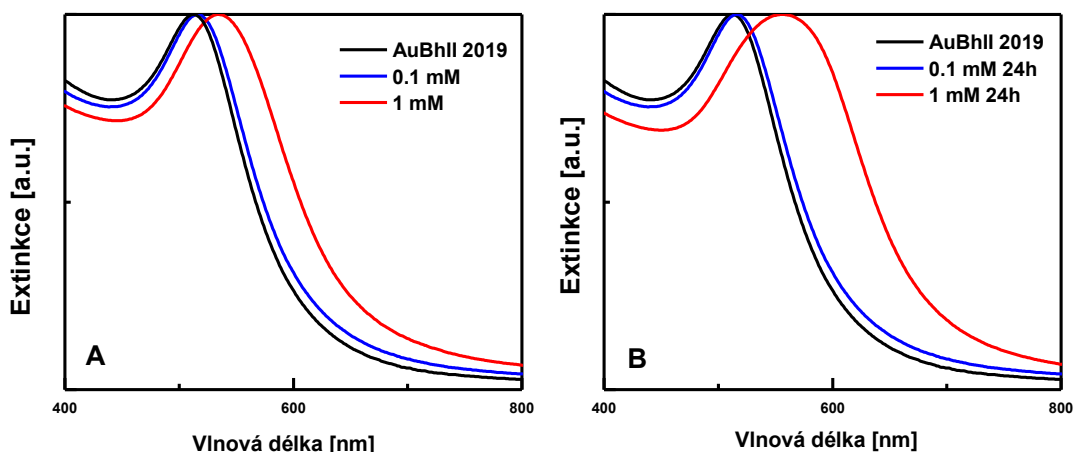
Interakce 1mM systému NAPCy se starším borohydridovým koloidem (Obr. 43) dala vznik druhému agregačnímu maxima, které dosahovalo ještě větší intenzity než původní maximum. Po 24 h se nově vzniklé agregační maximum posunulo z oblasti okolo 620 nm na 650 nm.



Obr. 43 Extinkční spektrum NAPCy ve dvou finálních koncentracích v interakci se starším borohydridovým koloidem AuBhII. A – měřeno ihned po přidavku NAPCy, B – měřeno po 24 h.

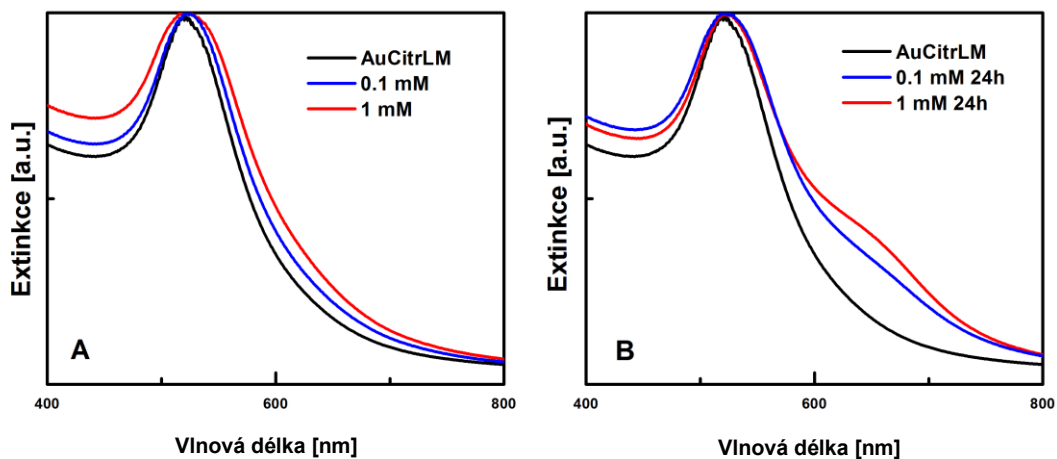
Ramanův rozptyl byl měřen s použitím excitace 785 nm, avšak signál SERS překvapivě nebyl detekován. Bylo by vhodnější použít laser s excitací laseru 633 nm, kterou bohužel nebylo disponováno.

Připraven byl také systém pro sledování interakce NAPCy s čerstvým zlatým borohydridovým koloidem (Obr. 44). Z extinkčního spektra je zřejmé, že agregace u 1mM systému probíhá a dochází k pravidelnému posunu plasmonového pásu, avšak bez vzniku druhého agregačního maxima, což odpovídá chování systému v přítomnosti polyborátů na povrchu staršího koloidu a iontových borátů na povrchu čerstvého. Připravena byla také koncentrace 0.5 mM (bez ethanolu). Ramanův rozptyl nebyl měřen z důvodu povahy extinkčních spekter.



Obr. 44 Extinkční spektrum NAPCy ve dvou finálních koncentracích v interakci s čerstvým borohydridovým koloidem AuBhII 2019. A – měřeno ihned po přidavku NAPCy, B – měřeno po 24 h.

System byl připraven také s citrátovým zlatým koloidem (Obr. 45). Rovněž i koncentrace 0.5 mM. Z extinkčních spekter je zřejmé, že dochází k agregaci, a že systém s příspěvkem menší koncentrace agreguje více. Měření Ramanova rozptylu nebylo provedeno z důvodu nevyhovujících dostupných excitačních délek laserů. System by totiž bylo vhodné změřit při excitaci 633 nm.



Obr. 45 Extinkční spektrum NAPCy ve dvou finálních koncentracích v interakci s citrátovým koloidem AuCitrLM. A – měřeno ihned po přidavku NAPCy, B – měřeno po 24 h.

Hodnoty DLS a zeta potenciálů pro systémy s NAPCy se zlatými koloidy jsou uvedeny v Tab. 16 a Tab. 17.

Tab. 16 Distribuce velikostí u vybraných systémů s NAPCy. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		distribuce velikostí [nm]								
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného NAPCy							
			0.1 mM		0.5 mM		1 mM			
AuBhl1	intenzita	pk ₁	42 ± 22	(82%)	85 ± 70	(88%)	1205 ± 615	(61%)		
		pk ₂	2 ± 1	(7%)	4347 ± 353	(12%)	197 ± 70	(25%)		
		pk ₃	3 ± 1	(1%)			4399 ± 875	(13%)		
	počet	pk ₁	1 ± 0.4	(100%)	15 ± 5	(100%)	238 ± 95	(98%)		
		pk ₂					1333 ± 492	(2%)		
AuBhl19	intenzita	pk ₁	194 ± 63	(90%)		31 ± 12	(55%)			
		pk ₂	9 ± 2	(10%)		424 ± 160	(45%)			
	počet	pk ₁	7 ± 2	(100%)		19 ± 5	(100%)			
AuCitrLM	intenzita	pk ₁	81 ± 32	(60%)	115 ± 34	(68%)	120 ± 42	(60%)	268 ± 136	(62%)
		pk ₂	295 ± 100	(23%)	27 ± 6	(32%)	32 ± 8	(34%)	56 ± 18	(30%)
		pk ₃	20 ± 5	(17%)			5 ± 1	(6%)	10 ± 2	(5%)
	počet	pk ₁	10 ± 2	(100%)	4 ± 1	(100%)	8 ± 1	(100%)	19 ± 4	(99%)
		pk ₂							6 ± 2	(1%)

Na základě DLS měření lze pro systémy s NAPCy na zlatých koloidech pozorovat nárůst velikosti částic, a to zejména pokud je koncentrace NAPCy 1mM. Rovněž při nižší koncentraci NAPCy se systém vyznačuje jistou frakcí větších částic, odpovídající nejspíše tvorbě agregátů. Tato pozorování jsou v souladu s naměřenými UV-Vis spektry.

Pro citrátový koloid v interakci s NAPCy je patrný též nárůst velikostí částic s rostoucí koncentrací NAPCy a dochází ke zvýšení procentuálního obsahu větších částic. Tyto výsledky korelují s UV-Vis spektry pro dané systémy.

Tab. 17 Hodnoty zeta potenciálů u vybraných systémů s NAPCy. Závorky uvádí procentuální zastoupení hodnot.

		zeta potenciál [mV]							
		pouze koloid	finální koncentrace přidaného NAPCy						
			0.1 mM	0.5 mM	1 mM				
AuBhlI	pk₁	-24 ± 8	(100%)	-21 ± 7	(91%)	–	-32 ± 4	(100%)	
	pk₂			2 ± 4	(8%)				
AuBhlI 19	pk₁	-29 ± 9	(95%)			-21 ± 13	(99%)		
	pk₂	-58 ± 3	(2%)	–		-84 ± 2	(0.3%)	–	
	pk₃	121 ± 2	(2%)			147 ± 1	(0.1%)		
AuCitrLM	pk₁	-26 ± 9	(94%)	-28 ± 9	(100%)	-24 ± 7	(98%)	-31 ± 7	(100%)
	pk₂	-50 ± 4	(6%)			-51 ± 3	(1.1%)		

Hodnoty zeta potenciálů pro NAPCy se zlatými nanočásticemi naznačují stabilní systémy, a to i pro koncentrace 1mM NAPCy. Toto zdánlivě neodpovídá naměřeným UV-Vis spektrům a zjištěným DLS výsledkům, ale pouze zdánlivě. Je totiž nutno uvážit, jak se systémy chovají po 24 h, kdy je dle UV-Vis spektra stále patrné druhé maximum (které právě odpovídá obsahu větších částic či agregátů stabilizovaných v roztoku) a pozice tohoto maxima není daleko od maxima pozorovaného ihned po přípravě systému. Je tudíž zřejmé, že dojde k nárůstu velikostí částic a tvorbě agregátů, ale tyto agregáty jsou do jisté míry stabilizovány přítomností NAPCy, o čemž svědčí právě hodnoty naměřených zeta potenciálů pro tyto systémy.

5 ZÁVĚR

V rámci předkládané práce byla vypracována literární rešerše na zadanou problematiku. Dále byla interpretována IČ a Ramanova spektra v pevném i roztokovém skupenství. Borohydridovou metodou byla provedena příprava nanočástic zlata a stříbra. Pomocí spektroskopie UV-Vis, měření DLS a zeta potenciálů byla sledována interakce látek a koloidů s ohledem na rozdílné chemické složení jejich povrchů. Jedním z cílů bylo zjistit, zda se látky vážou na povrch stříbrných a zlatých nanočástic, a pokud ano, tak jakým způsobem. Cystein byl detekován v interakci se zlatým citrátovým koloidem AuCitrLM za použití 785nm excitace, přičemž je pravděpodobné, že k interakci dochází vazbou přes síru. SERS signál NAPCy se podařilo detekovat pomocí excitace 532 nm, a to na čerstvě připraveném stříbrném borohydridovém koloidu AgBhIV a na hydroxylaminovém stříbrném koloidu AgHAC. V obou případech docházelo k interakci přes volnou karboxylovou skupinu. NACyM a taurin se nepodařilo detekovat ani na jednom z dostupných koloidů. Dále bylo zjištěno, že se ethanol neadsorbuje na nanočástice, a tudíž lze případně využívat jako vnitřní standard.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Abebe, W. a Mozaffari, M. S. (2011) Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies, *Cardiovascular disease* 1(3), pp. 293–311.
- (2) Atkins, P. a Julio, P. de (2013) *Fyzikální chemie*. 1. ed., VŠCHT Praha
- (3) Bazylewski, P., Divigalpitiya, R. a Fanchini, G. (2017) In situ Raman spectroscopy distinguishes between reversible and irreversible thiol modifications in L-cysteine, *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 7(5), pp. 2964–2970.
- (4) Bhattacharjee, S. (2016) DLS and zeta potential - What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 235, pp. 337–351.
- (5) Bin, P., Huang, R. a Zhou, X. (2017) Oxidation resistance of the sulfur amino acids: Methionine and cysteine, *BioMed Research International*, 17(12) pp. 1–6
- (6) Bromová, M., Dalihodová A., Holinková P. *et al.* (2010) Zdravotní rizika energetických nápojů, *Prevence úrazů, otrav a násilí* 4(2) pp. 205–224.
- (7) Brosnan, J. a Brosnan, M. (2006) 5th Amino Acid Assessment Workshop – The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview, *The Journal of nutrition*, 136(6), pp. 16365–16405.
- (8) Champion, A. a Kambhampati, P. (1998) Surface-enhanced Raman scattering *Chemical Society Reviews* 27, pp. 241–250.
- (9) Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D., Viveros-Contreras, R. *et al.* (2018) Zeta Potential of Food Matrices, *Food Engineering Reviews* 10(3), pp. 113–138.
- (10) Carvalho, P. M., Felício, R., Santos, N. *et al.* (2018) Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development, *Frontiers in Chemistry* 6(6), pp. 1–17.
- (11) Ceccotti, C., Al-Sulaivany, B., Al-Habbib, O. *et al.* (2019) Protective effect of dietary taurine from ROS production in European seabass under conditions of forced swimming, *Animals* 9(9), pp. 1–16.
- (12) Collin, C., Gautier, B., Gaillard, O. *et al.* (2006) Protective effects of taurine on human hair follicle grown in vitro, *International Journal of Cosmetic Science*, 28(4), pp. 289–298.

- (13) Delgado-Pérez, T., Bouchet, L., De La Guardia, M. *et al.* (2013) Sensing chiral drugs by using CdSe/ZnS nanoparticles capped with N-acetyl-L-cysteine methyl ester, *Chemistry - A European Journal*, 19(33), pp. 11068–11076.
- (14) Duchoň, J. (1985) *Lékařská chemie a biochemie: Učebnice pro lékařské fakulty*. 1. ed. Praha: Avicenum.
- (15) Escobar, Z., Bjartell, A., Canesin, G. *et al.* (2016) Preclinical Characterization of 3 β -(N-Acetyl L -cysteine methyl ester)-2 α β ,3-dihydrogaliellalactone (GPA512) a Prodrug of a Direct STAT3 Inhibitor for the Treatment of Prostate Cancer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(10), pp. 4551–4562.
- (16) Flora, S. J. S. a Pachauri, V. (2010) Chelation in metal intoxication, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(7), pp. 2745–2788.
- (17) Freire, P. T. C., Melo, F. E. A. a Mendes Filho, J. (1996) Polarized Raman and infrared spectra of taurine crystals, *Journal of Raman Spectroscopy*, 27(7), pp. 507–512.
- (18) Hardy, D. L. a Norwood, T. J. (1998) Spectral Editing Technique for the in Vitro and in Vivo Detection of Taurine, *Journal of Magnetic Resonance*, 133(1), pp. 70–78.
- (19) Hasan, T., Arora, R., Bansal, A. *et al.* (2019) Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer, *Experimental and Molecular Medicine*, 51(2), pp. 1–18
- (20) Haufroid, V. a Lison, D. (2005) Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: A minireview, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 78(5), pp. 343–354.
- (21) Horák, J., Linhart, I. a Klusoň, P. (2004) *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. ed. VŠCHT Praha
- (22) Jakubowski, H. (2019) *Amino Acid Stereochemistry*, Biochemistry online. Dostupné z: [https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Online_\(Jakubowski\)/02%3A_PROTEIN_STRUCTURE/2A%3A_Amino_Acids/A02._Amino_Acid_Stereochemist ry.pdf](https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Online_(Jakubowski)/02%3A_PROTEIN_STRUCTURE/2A%3A_Amino_Acids/A02._Amino_Acid_Stereochemist ry.pdf). (Aktivní k 3. 8. 2020)
- (23) Kania, P. (2007) *Infračervená spektrometrie*, VŠCHT Praha Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektr ometrie.pdf?redirected> (Aktivní k 3. 8. 2020)

- (24) Kelly, S. a Price, N. (2005) The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function, *Current Protein & Peptide Science*, 1(4), pp. 349–384.
- (25) Klomsiri, C., Karplus, P. A. a Poole, L. B. (2011) Cysteine-based redox switches in enzymes, *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(6), pp. 1065–1077.
- (26) Klouda, P. (2016) *Moderní analytické metody*, 3. ed. Ostrava: Pavko.
- (27) Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I. *et al.* (2002) Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *Journal of Physics Condensed Matter*, 14(18), pp. 1736-1742
- (28) Kodíček, M., Valentová, O. a Hynek, R. (2015) *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*, 1.ed., VŠCHT Praha
- (29) Konvička, O. (1998) *Česnek. Allium sativum L. Základy biologie a pěstování, obsahové látky a léčivé účinky*, 1. ed., Olomouc: vl. nákl.
- (30) Kotyk, A. a Slavik, J. (1989) *Intracellular pH and its Measurement*. 1. ed. Boca Raton FL, USA: CRC Press.
- (31) Kováč, Š. a Leško, J. (1980) *Spektrálne metody v organickej chémii*. Bratislava: Alfa.
- (32) Kučková, Š., Hamidi-Asl, E., Matulková, I. *et al.* (2018) Techniky a aplikace povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie se zaměřením na umělecká díla, *Chem. Listy*, 112(10), pp. 312–316.
- (33) Kumar, A., Das, N., Satija, N. K. *et al.* (2020) A novel approach towards synthesis and characterization of non-cytotoxic gold nanoparticles using taurine as capping agent, *Nanomaterials*, 10(45) pp. 1–19
- (34) Kvíčala, J. a Lapčík, O. (2002) Příklad jedenadvacáté aminokyseliny, *VESMÍR*, 81(4), pp. 193–195.
- (35) Laidlaw, S. A., Sturman, J. A. a Kopple, J. D. (1987) Effect of Dietary Taurine on Plasma and Blood Cell Taurine Concentrations in Cats, *The Journal of Nutrition*, 117(11), pp. 1945–1949.
- (36) Lima, R. J. C., Freire, P., Sasaki, J. M. *et al.* (2002) Temperature-dependent Raman study of L-arginine hydrochloride monohydrate single crystal, *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(8), pp. 625–630.
- (37) Liu, S. a Lämmerhofer, M. (2019) Functionalized gold nanoparticles for sample preparation: A review, *Electrophoresis*, 40(18–19), pp. 2438–2461.
- (38) Malvern Panalytical (2018) Dynamic light scattering: An introduction in 30 minutes. Technical note. Malvern Instruments Limited, pp. 1–17.

- (39) Mathias, P. I. a Hymer, C. B. (2017) Mercapturic acids: recent advances in their determination by liquid chromatography/mass spectrometry and their use in toxicant metabolism studies and in occupational and environmental exposure studies, *Environmental Exposure Studies*, 21(4), pp. 293–315.
- (40) Milata et al., V. (2008) *Aplikovaná molekulová spektroskopia*. Bratislava: Slovenská technická univerzita.
- (41) Moreira, R. L., Lobo, R., Dias, A. et al. (2018) Infrared dispersion analysis and Raman scattering spectra of taurine single crystals, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 188(7), pp. 276–284.
- (42) Nagano, N., Ota, M. a Nishikawa, K. (1999) Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins, *FEBS Letters*, 458(1), pp. 69–71.
- (43) Papet, I., Rémond, D., Darveded, D. et al. (2018) Sulfur Amino Acids and Skeletal Muscle, *Nutrition and Skeletal Muscle*. Academic Press, pp. 335–363.
- (44) Parker, S. F. (2013) Assignment of the vibrational spectrum of L-cysteine, *Chemical Physics*. Elsevier B.V., 424(5), pp. 75–79.
- (45) Picot, R. A. C., Puiatti, M., Altabef, B. et al. (2019) A Raman, SERS and UV-circular dichroism spectroscopic study of: N-acetyl-L-cysteine in aqueous solutions, *New Journal of Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 43(38), pp. 15201–15212.
- (46) Plaza, N. C., García-Galbis, M. R. a Martínez-Espinosa, R. M. (2018) Effects of the Usage of L-Cysteine on Human Health, *Molecules* Basel, Switzerland, 23(3), pp. 1–13.
- (47) Poopari, M. R., Dezhahang, Z. a Xu, Y. (2015) Identifying dominant conformations of N-acetyl-L-cysteine methyl ester and N-acetyl-L-cysteine in water: VCD signatures of the amide and the CO stretching bands, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 136(9), pp. 131–140.
- (48) Procházka, M. (1997) Probing applications of laser-ablated Ag colloids in SERS spectroscopy: Improvement of ablation procedure and SERS spectral testing, *Analytical Chemistry*, 69(24), pp. 5103–5108.
- (49) Prosser, V. et al., (1989) *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, pp. 337-365
- (50) Ramesh Kumar, A. a Teli, M. D. (2007) Electrokinetic studies of modified cellulosic fibres, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301(1), pp. 462–468.

- (51) Souza, J. M., Lima, R., Freire, P.T.C. *et al.* (2005) Raman spectra of deuteriated taurine single crystals, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(7), pp. 1525–1527.
- (52) Strauch, B. (1994) Laser Raman Spectrometry, *Instrumentation in analytical chemistry*, 2nd ed. Chichester: Ellis Horwood, pp. 233–257.
- (53) Stuart, B. H. (2013) *Forensic Analytical Techniques*. 1. ed., John Wiley & Sons.
- (54) Vilimovská, M. a Voldřich, K. (2011) Zeta potenciál jako indikátor povrchových vlastností, *Chemické listy*, 105(2), pp. 305–306.
- (55) Wang, Z., Zhao, B., Liu, X. *et al.* (2013) A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of S-phenylmercapturic acid in human urine, *Analytical Methods*, 5(21), pp. 6081–6085.
- (56) Wulandari, P., Wispriyono, B., Fitria, L. *et al.* (2018) Urinary S-Phenylmercapturic Acid (S-PMA) Level as Biomarkers of Exposure to Benzene in Informal Shoes Industrial Workers, Cibaduyut Bandung, *KnE Life Sciences*, 4(1), pp. 84–92.
- (57) Yin, J., Ren, W., Yang, G. *et al.* (2016) I-Cysteine metabolism and its nutritional implications, *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(1), pp. 134–146.

7 PŘÍLOHY

A Příprava koloidních roztoků

AgBhIV, AuBhII

Postup přípravy koloidních roztoků AgBhIV a AuBhII z roku 2017 byl shodný s přípravou borohydridových nanočástic uvedenou v experimentální části této práce. Navážka borohydridu sodného byla 3.39 mg pro AuBhII a 3.42 mg pro AgBhIV.

AgCitr 1:1

Ve 250 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 44.65 mg dusičnanu stříbrného. Roztok byl přiveden k varu a za stálého míchání bylo přidáno 10 ml 1% vodného roztoku citrátu sodného. Systém byl udržován ve varu po dobu jedné hodiny a následně vymícháván na pokojovou teplotu přibližně další hodinu. Získaný koloid byl naředěn deionizovanou vodou v poměru 1 : 1 (v/v).

AuCitrLM (*označení LM dle Lee-Meisel, J. Phys. Chem. 1982*)

Ve 204.5 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 78.43 mg kyseliny tetrachlorozlatité. Roztok byl přiveden k varu a bylo přidáno 20.46 ml 1% vodného roztoku citrátu sodného. Systém byl udržován ve varu po dobu jedné hodiny a poté vymícháván na pokojovou teplotu přibližně další hodinu.

AgHAC (*připraveno dle citace Leopold N. a Lendl B. J. Phys. Chem. B 2003, 107, 5723*)

Vodný roztok dusičnanu stříbrného o koncentraci 10 mM a o objemu 10 ml byl přidán k 90 ml 1.67mM vodného roztoku hydroxylaminu hydrochloridu. Dále byl přidán 3.3 mM roztok hydroxidu sodného. Následně byl roztok vymícháván přibližně půl hodiny.

B Detekce signálu SERS u systému 0.5mM L-cystein AuCitrLM

